

OPTIMIERUNG DER RADIOIMMUNOLOGISCHEN
BESTIMMUNGSMETHODEN
VON CORTISOL UND CALCITONIN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität
zu München

Günter Stalla

1980

1981

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK INNENSTADT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROFESSOR Dr. E. BUCHBORN

OPTIMIERUNG DER RADIOIMMUNOLOGISCHEN
BESTIMMUNGSMETHODEN
VON CORTISOL UND CALCITONIN *

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
AN DER LUDWIG MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

vorgelegt von
Günter Stalla
aus Raubling

1980

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 51)

MEINEN ELTERN



Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter:	Prof.Dr.med. P. C. Scriba
	PD Dr.med. O. A. Müller
Mitberichterstatter:	Prof. Dr.med. E. Buchborn
Dekan:	Prof. Dr.med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung 15.1.81

Mein Dank gilt

Herrn Prof. Dr. med. P. C. Scriba für die Überlassung
des Themas und für die Unterstützung und Förderung,
die er mir und dieser Arbeit gewährte,

Herrn PD Dr. med. O. A. Müller und

Herrn Dr. phil. W. G. Wood für die Betreuung und
Beratung während der Versuche sowie die beim Verfassen
der Arbeit gewährte Hilfe,

Herrn Dipl. Chem. G. Giesemann vom Organisch-Chemischen
Institut Garching der TU München für die Ratschläge und
die Unterstützung bei den Arbeiten zur Synthese der
Cortisolderivate,

Herrn Dipl. Math. M. Bauer für die Mithilfe bei den
Programmierarbeiten,

Frau R. Egger, Fräulein C. Uhlig und Fräulein C. Wachter
für die Assistenz bei einigen Versuchen,

Frau I. Wiktorin für die sorgfältige Anfertigung der
Zeichnungen und Fräulein F. Haag für das Ausführen der
photographischen Arbeiten.

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
<u>1. ZIELSETZUNG</u>	1
<u>2. CORTISOL</u>	3
2.1. <u>Vorbemerkungen</u>	3
2.2. <u>Zur Herstellung von</u> <u>Cortisolverbindungen</u>	8
2.2.1. Material und Geräte	8
2.2.2. Laboratoriumstechnik	10
2.2.2.1. Einleiten von HCl in Lösungsmittel	10
2.2.2.2. Reinigung von Substanzen	10
2.2.2.3. Trocknen von Substanzen	15
2.2.2.4. Analytische Methoden	16
2.3. <u>Synthese eines Cortisol-3-(O-</u> <u>Carboxymethyl)Oxims (CMO)</u>	18
2.3.1. Vorversuche	18
2.3.1.1. Reaktion über Enaminbildung	19
2.3.1.2. Direkte Umsetzungen	21
2.3.2. Methodik	23
2.3.2.1. Lösungsmittel	23
2.3.2.2. Einfluß der Temperatur und der molaren Verhältnisse	25
2.3.2.3. Umsetzung unter Pyridinkatalyse	27
2.3.2.4. Reinigung	28
2.3.3. Ergebnisse	29
2.4. <u>Antigenherstellung</u>	31
2.4.1. Methodik	32
2.4.1.1. Carbodiimid-Reaktion	32
2.4.1.2. Gemischte Anhydrid-Reaktion	34
2.4.2. Ergebnisse	34

	<u>Seite</u>
2.5.	<u>Tracerherstellung</u> 37
2.5.1.	Methodik 37
2.5.1.1.	Derivatbildung 37
2.5.1.2.	Markierung 38
2.5.1.2.1.	Prinzip 38
2.5.1.2.2.	Markierungsablauf 38
2.5.1.2.3.	Vorversuche zur Markierung 39
2.5.1.2.4.	Reinigung 40
2.5.1.2.5.	Vorversuche zur Reinigung 42
2.5.2.	Ergebnisse 43
2.6.	<u>Reduktive Aminierung</u> 44
2.6.1.	Methodik und Ergebnisse 44
2.6.1.1.	Leuckart-Wallach Reaktion 44
2.6.1.2.	Weitere reduktive Aminierung 47
2.6.2.	Zusammengefaßte Ergebnisse 50
2.7.	<u>Antikörpergewinnung</u> 51
2.7.1.	Methodik 51
2.7.2.	Ergebnisse 52
2.7.2.1.	Titerverlauf 52
2.7.2.2.	pH-Abhängigkeit 54
2.8.	<u>RADIOIMMUNOASSAY</u> 56
2.8.1.	Prinzip 56
2.8.2.	METHODIK UND VORVERSUCHE 56
2.8.2.1.	Material 56
2.8.2.1.1.	Reagenzien 56
2.8.2.1.2.	Geräte 58
2.8.2.1.3.	Pufferlösungen 58
2.8.2.1.4.	Cortisolstandardlösungen 59
2.8.2.1.5.	Gewinnung und Aufbewahrung der Seren 60

2.8.2.1.6.	Verwendete Antiseren und Tracer	60
2.8.2.2.	Vorversuche mit dem Antiserum Kuss	61
2.8.2.3.	Kinetik der Tracerbindung	65
2.8.2.4.	"Cortisol-freies" Serum	66
2.8.2.5.	Denaturierung der Cortisol-bin- denden Serumproteine	72
2.8.2.6.	Trennung von gebundenem und freiem Antigen	76
2.8.2.6.1.	Fällung mit einer Polyäthylen- glycol-Lösung	76
2.8.2.6.2.	Doppelantikörper-Methode	76
2.8.2.6.3.	Verschiedene Inkubations- bedingungen	78
2.8.2.6.4.	Optimierung der Doppelantikörper- Technik	79
2.8.2.6.5.	Zentrifugation und Filtration	80
2.8.2.7.	Endgültiger Cortisol-Radioimmuno- assay	82
2.8.2.8.	Automatisierung	83
2.8.2.9.	Auswertung, Eichkurve (Kalibrier- kurve) und Empfindlichkeit	86
2.8.3.	RECHENPROGRAMME	88
2.8.3.1.	Tabel	90
2.8.3.2.	Dial	92
2.8.3.3.	Scatch	95
2.8.4.	ERGEBNISSE	104
2.8.4.1.	Qualitätskontrolle	104
2.8.4.2.	Spezifität	108
2.8.4.3.	Affinitätsstudien	110
2.8.4.4.	Kapazität	110

	<u>Seite</u>
2.8.4.5.	Vergleich verschiedener Methoden und Antiseren 113
2.8.4.6.	Normalkollektiv 115
2.8.5.	DISKUSSION 116
2.8.5.1.	Cortisolverbindungen 116
2.8.5.2.	Radioimmunoassay 117
<u>3.</u>	<u>CALCITONIN</u> 119
3.1.	Einführung 119
3.2.	METHODIK UND VORVERSUCHE 121
3.2.1.	Material 121
3.2.2.	Spezifisches Antiserum 124
3.2.3.	Calcitonin-freies Serum 126
3.2.4.	Markierung 131
3.2.5.	Trennung von gebundenem und freiem Antigen 135
3.2.5.1.	Doppelantikörpermethode 135
3.2.5.2.	Optimierte Doppel-antikörpermethode 136
3.2.5.3.	Trennung mit einem trägergebundenen 2. Antikörper 138
3.2.6.	Einfluß der Temperatur auf den Assay 140
3.2.7.	Endgültiger Calcitonin-Radioimmunoassay 141
3.2.8.	Eichkurve und Empfindlichkeit 142
3.3.	ERGEBNISSE 145
3.3.1.	Qualitätskontrolle 145
3.3.2.	Affinitätsstudien 147

	<u>Seite</u>
3.3.3.	Klinische Studien 148
3.3.3.1.	Normalkollektiv 148
3.3.3.2.	hCT-Spiegel bei Patienten mit medullärem Schilddrüsen-Ca 150
3.3.3.3.	Calcitonin als Tumormarker 151
3.4.	DISKUSSION 152
<u>4.</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u> 155
<u>5.</u>	<u>LITERATUR</u> 159

ABKÜRZUNGEN

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AG	Antigen
Ak ₁ , 1. Ak	spezifisches Antiserum (antigenspezifisch)
Ak ₂ , 2. Ak	2. Antiserum (speziesspezifisch)
B	gebundenes Antigen
B ₀	Maximalbindung
Bq	Becquerel
BSA	Rinderalbumin
CBG	Corticosteroidbindendes Globulin
CDI	Carbodiimid
CT	Chloramin T
Ci	Curie
CMO	Carboxymethoxylamin bzw. Carboxymethyloxim
CPM	Zählraten pro Minute
DC	Dünnschichtchromatographie
EE	Essigsäureäthylester
ES	Essigsäure
F	freies Antigen
³ H	Tritium
hCT	menschliches Calcitonin
HSA	menschliches Albumin
IR	Infrarot
¹²⁵ J-Cortisol	mit ¹²⁵ J markiertes Cortisolderivat
M	molar
N	unspezifische Bindung bzw. Anzahl
n	normal
NNR	Nebennierenrinde
PEG	Polyäthylglycol
PTH	Parathormon

RIA	Radioimmunoassay
s	Standardabweichung
T	Gesamtaktivität
TG	Thyreoglobulin
TG/4	Untereinheit des Thyreoglobulins
TME	Thyroxinmethylester
VK	Variationskoeffizient
$\bar{x}$	Mittelwert

1. ZIELSETZUNG

Radioimmunologische Bestimmungsmethoden zur Messung kleinster Hormonkonzentrationen haben sich schon lange gegenüber den arbeitsaufwendigen und in der Regel nicht sehr empfindlichen biologischen Nachweismethoden durchgesetzt (39). Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Optimierung von Radioimmunoassays für zwei Hormone sehr unterschiedlicher chemischer Konfiguration, dem Steroidhormon Cortisol (s. 2.1.) und dem Peptidhormon Calcitonin (s. 3.1.). Dazu mußten besondere methodische Probleme bearbeitet werden:

1. Die Herstellung geeigneter Antigene zur Gewinnung hochspezifischer Antiseren, die möglichst nur mit dem zu messenden Hormon reagieren - d. h. geringe Kreuzreaktion des Cortisols mit anderen endogenen oder therapeutisch eingesetzten Steroiden.
2. Die Herstellung eines mit ^{125}J (s. 2.1.) radioaktiv markierten Hormons (Calcitonin) bzw. die vorausgehende chemische Synthese eines zur Markierung geeigneten Hormonderivates (Cortisol), dessen Immunreaktivität bei hoher spezifischer Aktivität erhalten sein muß. (56).
3. Ein extraktiver Schritt zur Abtrennung des Hormons von den bindenden Serumproteinen (Cortisol) vor der eigentlichen radioimmunologischen Messung (13) bzw. die Konzentrierung bei sehr geringem Serumspiegel (Calcitonin) sollte möglichst umgangen werden (34).

4. Die Trennung des Antikörper-gebundenen (= Bound) vom nicht gebundenen Hormonanteil (= Free) soll so gestaltet sein, daß die Methode schnell, sicher und preisgünstig ist, um große Probenzahlen bewältigen zu können, eventuell unter Einsatz automatisierter RIA-Techniken (48).
5. Für die jeweils optimierten Cortisol- und Calcitonin-Radioimmunoassays sollten die Kriterien der Qualitätskontrolle genau untersucht werden sowie ausgewählte Beispiele klinischer Anwendung.

2. CORTISOL

2.1. Vorbemerkungen

Die Nebennierenrindenhormone bilden zusammen mit den Hormonen aus den Gonaden die Gruppe der Steroidhormone.

Die Regulation der Cortisolsekretion erfolgt durch einen Reglerkreis (Hypothalamus-Hypophyse-NNR), der in der Kybernetik als Reglerkreis mit negativer Rückkopplung und variabler Einstellung bezeichnet wird (44).

Steroide werden im menschlichen Serum, ähnlich wie andere niedermolekulare Stoffe (4) an Proteine gebunden (8). Diese Kenntnis wurde 1956 von DAUGHADAY und BUSH und unabhängig davon von SLAUNWHITE und ANTONIADES durch die Entdeckung eines spezifischen Proteins, das Corticosteroide mit hoher Affinität aber geringer Kapazität binden kann, erheblich erweitert. Es wird CBG (Corticosteroid-binding-globulin) genannt und unterscheidet sich wesentlich in seinem Verhalten vom Albumin, dessen Ligandenspezifität gering, dessen Kapazität dagegen groß ist (10, 20). Dem CBG wird eine fundamentale Bedeutung bei der Regulation, dem Transport und der Ausscheidung von Corticosteroiden zugeordnet.

Die Wirkungen des Cortisols im Gesamtorganismus umfassen vor allem die Gluconeogenese in der Leber und den katabolen Effekt im Eiweißstoffwechsel. Es verfügt über insulinantagonistische Wirkung im Kohlenhydratstoffwechsel und minerolocortocoidähnliche Wirkungen auf den Elektrolythaushalt.

Therapeutisch beeinflussen Cortisol und seine synthetischen Derivate die exsudative und proliferative Phase des Entzündungsgeschehens. Es hemmt die Antikörperbildung und das lymphatische System (9, 66).

Bereits kurz nach Einführung des Radioimmunoassays für Proteohormone (93) wurden die ersten Assays für Steroidhormone nach dem Prinzip der "Competitive-Protein-Binding Analysis" (57) entwickelt, einige Jahre danach die entsprechenden Radioimmunoassays (1, 3, 49).

Die Bestimmung des Gesamt-Cortisols im Serum erfolgte bisher in den hiesigen Laboratorien nach folgendem radioimmunologischen Methodenprinzip (7, 35): Nach Inkubation der Serumprobe mit ^3H -Cortisol-Tracer wird das Cortisol auf Sephadex-Säulchen im sauren Milieu quantitativ aus dem Serum extrahiert und absorbiert. Nach einem Umpufferungsschritt wird durch Nachwaschen mit der Cortisol-Antikörper-Lösung der an den Antikörper gebundene Anteil des ^3H -Cortisols eluiert und zur Messung der Radioaktivität gesammelt. Anschließend wird der freie Anteil des ^3H -Cortisols mit Cortisol-freiem Nachwaschserum eluiert.

Diese Methode hatte den Nachteil, daß der Arbeitsaufwand relativ groß ist, daß die Kapazität wie bei allen säulenchromatographischen Methoden von 12 Seren mit Doppelwerten pro Durchgang gering ist und daß ^3H -Tracer verwendet wird. Diesem Tracer muß Szintillationsgemisch

zugegeben werden, das geschüttelt und gekühlt werden muß. Neben den Kosten bereitet die Abfallbeseitigung bei der Halbwertszeit des Tritiums von 12 Jahren Probleme.

Aufgrund ihres geringen Molekulargewichts haben Steroidhormone keine eigene Antigenität (28, 56). Das Hapten muß an ein Makromolekül gekoppelt werden, meist wird BSA verwendet (1). Wegen guter Erfahrungen mit der Kopplung an Thyreoglobulin (73) bei der Herstellung von Antiseren gegen kleine Peptidhormone setzten wir diese Methode auch für das Cortisol ein. Für die zur Kopplung notwendige stabile Peptidbindung muß in das Steroid zuerst eine reaktive Gruppe eingeführt werden. Dazu wird eine oxygene Funktion (Keto- oder Hydroxylgruppe) in ein Oxim oder ein Hemisuccinat umgewandelt, deren Carboxyl-Gruppe mit dem Peptid reagiert. Von entscheidender Bedeutung ist aus Spezifitätsgründen die Stelle der Kopplung am Hapten. Die endogenen Steroide unterscheiden sich in aller Regel durch die unterschiedlichen funktionellen Gruppen im C- und D-Ring des Cyclopentanoperhydrophenanthren-Gerüsts, aus dem auf enzymatischem Weg die entsprechenden Hormone aufgebaut werden (43). Deshalb bietet sich beim Cortisol wie bei anderen Steroiden die Kopplung an der Ketogruppe der C₃-Stelle des A-Ringes an. Da aber das Cortisol an der C₂₀-Stelle eine weitere Keto-Gruppe besitzt, ist es wichtig, nur hoch gereinigte C₃-Haptene zu verwenden (siehe Abb. 1).

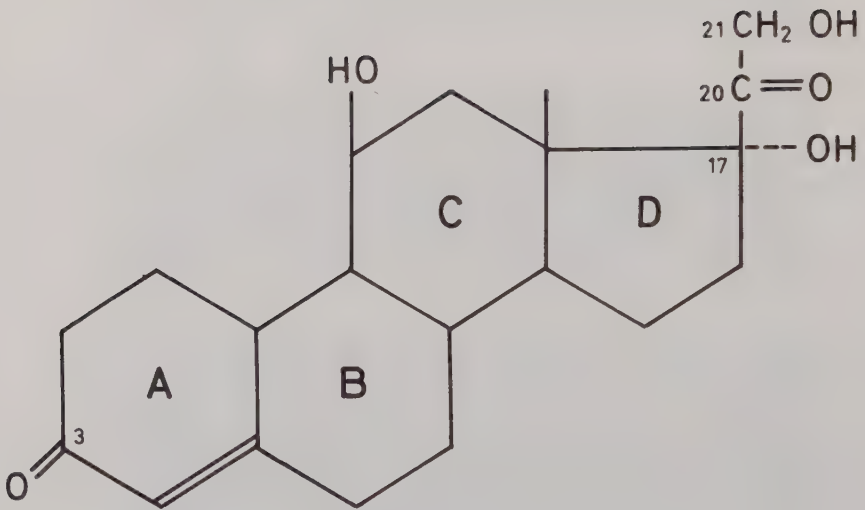


Abb. 1: Die Strukturformel von Cortisol

Als Tracer eignen sich Steroide, die mit ^3H , ^{125}J oder ^{131}J markiert sind. Aus den bekannten Gründen, nämlich der wesentlich höheren spezifischen Aktivität, dem einfacheren, billigeren und schnelleren Zählen sowie der günstigeren Abfallbeseitigung bietet sich die Jodmarkierung an. Das ^{125}J hat gegenüber dem ^{131}J die Vorteile einer längeren Halbwertszeit von 60 Tagen gegenüber 8,1 Tagen. Es ist ein reiner γ -Strahler von niedriger Energie (35 keV), verfügt über einen höheren Reinheitsgrad von 99 % gegenüber 27 % für ^{131}J und ist mit hoher Ausbeute im Zählgerät leicht meßbar (ca. 150 Lichtquanten pro 100 Photonen).

Außer am phenolischen Ring der natürlichen Östrogene können die Steroide nicht direkt jodiert werden, wobei diese Markierung der Östrogene zur Konfigurationsänderung und zum Verlust der Immunreaktivität führt (56). Zur Markierung muß also an das Cortisol eine phenolische Gruppe wie z. B. die des Tyramins, Thyroxins, Thyrosinmethylesters, Histidins usw. angelagert werden und zwar so, daß die Immunreaktivität erhalten bleibt.

Die folgenden Abschnitte dieser Arbeit befassen sich daher mit der Herstellung von Cortisolverbindungen zur Markierung und Immunisierung und mit dem Aufbau eines Cortisol-Radioimmunoassays.

2.2. Zur Herstellung von Cortisolverbindungen

2.2.1. Material und Geräte

N-Äthyl-N-(3dimethylaminopropyl) Carbodiimid	
	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Carboxymethoxylamin-Hemihydrochlorid	
	EGA-Chemie, Frankfurt
Cortisol	Behringwerke, Marburg
Freund's komplettes Adjuvans	
Gelatine	Baker, USA
Kieselgel DC-Alu- und Plastikfolien 60 F 254 0,2 mm	
Kieselgel PSC-Fertigplatten 60 F 254 2 mm	
Molekularsieb 4 Å	
¹²⁵ Natriumjodid	Amersham-Buchler, Braunschweig
Pertussis Impfstoff	Behringwerke, Marburg
Progesteron	
Sephadex G 10 fine und - LH 20 Pharmacia, Freiburg	
Serumalbumin vom Rind	Sigma, Taufkirchen
Testosteron	
Thyreoglobulin	Sigma, Taufkirchen
Tyramin-Hydrochlorid	
Tyrosin-Hydrochlorid	
Tyrosinmethylester-Hydrochlorid	

Alle in dieser Liste genannten Präparate ohne Firmenangabe stammten einschließlich aller verwendeten Lösungsmittel (p. A.) von der Firma Merck, Darmstadt.

Chromatographie-Kammer	Desaga, Heidelberg
Duo-Strahler Min. UVIS	Desaga, Heidelberg
Hydraulische Presse	Perklin-Elmer, USA
Infrarot-Spektrophotometer 177	Perklin-Elmer, USA
Pumpe AEG Typ Adea 80 K4	AEG, München
Rotationsverdampfer	Büchl, Schweiz
Statotherm	Desaga, Heidelberg

2.2.2. Laboratoriumstechnik

2.2.2.1. Einleiten von HCL in Lösungsmittel

Bei bestimmten Reaktionen, wie z. B. der reduktiven Aminierung (siehe 2.6.) ist es notwendig, daß eine definierte Menge von H^+ -Ionen im organischen Lösungsmittel trocken, d. h. wasserfrei, bleibt. Somit ist es also nicht möglich, das Lösungsmittel einfach mit der gewünschten Menge Salzsäure zu versetzen, sondern das HCL muß trocken, d. h. gasförmig, eingeleitet werden.

Das Gaseinleitungsrohr wird von der HCL-Druckflasche über eine Sicherheitsflasche in eine H_2SO_4 -Waschflasche zum Trocknen eingeleitet und von dort über eine weitere Sicherheitsflasche in das Reaktionsgefäß unter den Flüssigkeitsspiegel des Lösungsmittels. Die Sicherheitsgefäße sind unbedingt notwendig, da die Gefahr besteht, daß die Flüssigkeit in Teile der Apparatur und des Ventils zurücksteigt. Das Reaktionsgefäß wird mit einem Trockenrohr versehen und muß wegen der entstehenden Lösungswärme unter ständigem Rühren der Flüssigkeit gekühlt werden. Durch Wiegen des Gefäßes bestimmt man die Menge der gelösten HCL.

2.2.2.2. Reinigung von Substanzen

Unter diskontinuierlicher Extraktion versteht man das Ausschütteln von Lösungen. Diese wichtige Reinigung wurde zur Abtrennung von Steroidderivaten von den Ausgangssubstanzen eingesetzt. Für dieses System eignet

sich Essigsäureäthylester (EE) und 0,1 n HCl bzw. 0,1 n NaOH. Zur besseren Extraktion muß das Extraktionsmittel in kleineren Volumina und dafür öfters zugesetzt werden.

Die Dünnschichtchromatographie (DC) ist eine Verteilungschromatographie in erster Linie zwischen Wasser und organischem Laufmittel. Dabei ist das Wasser als dünne Schicht die stationäre Phase auf dem Kieselgelträger und das organische Lösungsmittel die mobile Phase. Das Kriterium dabei ist die Löslichkeit der verschiedenen Substanzen im Laufmittel. Je polarer sie sind, desto weniger Laufstrecke legen sie zurück. Salze bleiben, weil sie sehr polar sind, am Start liegen.

Die DC war für diese Arbeit das wohl wichtigste Trennverfahren, das wir für die Oximherstellung (siehe 2.3.2.4.) und Tracerreinigung (siehe 2.5.1.2.4.) benötigten. Wir setzten sie zur Identifizierung von Substanzen (gleiche Laufstrecke!), zur Reinheitsüberprüfung von Reaktionsprodukten (Einheitlichkeit!) und vor allem auch zur qualitativen Verfolgung von Reaktionen ein.

Als Träger der Adsorptionsschicht dienten Aluminium- oder Kunststoffplatten, für die präparative DC Glasplatten. Als Adsorbentien verwendeten wir nach Austestung mit Gips vermischte Kieselgele und als Fließmittel nach umfangreicher Austestung für alle Systeme Essigsäureäthylester : Essigsäure : H_2O = 9 : 1 : 0,1

(siehe Abb. 2: DC während Cortisol-CMO-Synthese), geeignet zur Tracerreinigung ist auch Chloroform : Methanol : H_2O = 9 : 1 : 0,1 (2). Für den qualitativen Einsatz und zur Tracerreinigung wurden Platten von 0,2 mm Schichtdicke, sonst Platten von 2 mm Schichtdicke verwendet.

Die Entwicklung erfolgte in einer dicht verschließbaren Kammer, deren Atmosphäre mit den Dämpfen des Fließmittels durch eingelegte Filterpapierstreifen gesättigt ist.

Die hier aufgeführten Substanzen waren im UV-Licht bei 254 nm sichtbar. Dem Adsorbens war Fluoreszenz-Indikator zugemischt. Es erschienen alle im UV absorbierenden Stoffe beim Betrachten im UV-Licht als dunkle Flecken auf der fluoreszierenden Schicht, da sie die Fluoreszenz löschen. Durch Bedampfen mit Jod wurden die jeweiligen Substanzen zur Dokumentation sichtbar gemacht. Hierzu legte man das Chromatogramm in ein verschließbares Gefäß, das einige Jodkristalle enthält. Die Substanz erscheint als brauner Fleck. Gelegentlichen Einsatz fand eine Sprühreagenz wie Ninhydrin.

Dialysetechnik und Einengen verwendeten wir, um das Antigen vom Hapten und anderen Bestandteilen zu reinigen und das Volumen einzuengen (siehe 2.4.1.). Erst danach ist eine Aussage über eine erfolgreiche Umsetzung möglich. Die Verkleinerung und Reinigung der

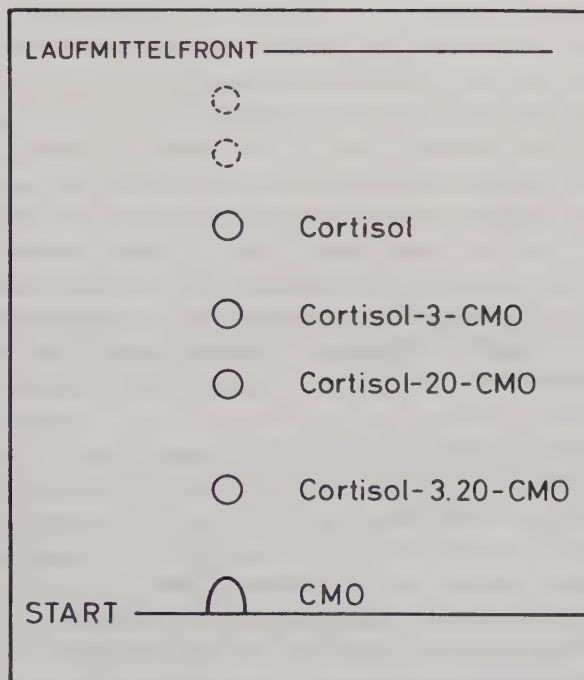


Abb. 2: Dünnschichtchromatographie des Reaktions-
gemisches einer Cortisol-CMO-Synthese
(vom Original abgezeichnet)
Laufmittel: Essigsäureäthylester : Essig-
säure : Wasser = 9 : 1 : 0,1
(λ = 254 nm)

Reaktionslösung wird durch Unterdruck außerhalb einer Kollodiumhülle vorgenommen. Die Kollodiumhülle ist eine semipermeable Membran, die für kleine Ionen, wie z. B. Salze, durchlässig ist, nicht jedoch für Proteine. Sie wird auf die Ausflußöffnung eines Trichters gesteckt, der luftdicht durch einen Gummiringverschluß auf eine Saugflasche aufgesetzt wird, die mit Aqua bidest. gefüllt ist. Nachdem der Trichter mit der Proteinlösung gefüllt worden ist, wird durch Anschließen des Gefäßes an eine Wasserstrahlpumpe ein Unterdruck erzeugt, durch den das überschüssige Wasser bzw. Lösungsmittel und Salze abgesaugt werden, während die Proteine innerhalb der Membran bleiben. Es gilt dabei zwei Dinge zu beachten: Zum einen muß das Wasser in der Saugflasche mindestens dreimal gewechselt werden, zum anderen muß der Trichter mindestens dreimal mit 0,01 n NaOH nachgespült werden, um nicht umgesetztes Cortisol-3-CMO zu lösen und dann durch Dialyse zu entfernen. Anschließend spült man noch mit Aqua bidest. nach. Sobald die Lösung auf ca. 1 ml eingeeengt worden ist, hängt man das Vakuum ab und läßt frisches Aqua bidest. in die Kollodiumhülle zurückdiffundieren, damit die Proteine, die an der Membran adsorbieren, wieder in Lösung gehen. Anschließend kann die eingeengte Flüssigkeit entnommen werden.

2.2.2.3. Trocknen von Substanzen

Die Gefriertrocknung wurde eingesetzt, um das Antigen über einen längeren Zeitraum aufbewahren zu können (siehe 2.4.1.). Hierfür wurde die Proteinlösung bei -60°C zuerst tiefgefroren, dann im Lyophilisator unter Hochvakuum gebracht; dadurch sublimierte das Eis und der entweichende Wasserdampf wurde durch eine Pumpe, unterstützt durch einen Tiefkühlkondensator, so schnell entfernt, daß infolge der Verdunstungskälte das zu trocknende Protein im gefrorenen Zustand blieb.

Das Abdestillieren von Lösungsmittel im Rotationsverdampfer verwendeten wir zum Einengen und Vortrocknen von Substanzen (siehe 2.3.1., 2.3.2., 2.5.1., 2.6.1.). Die Lösung wird durch ständiges Rotieren, unter Vakuum (10 - 15 Torr) schonend erwärmt, so daß das Lösungsmittel durch den Unterdruck leicht verdampft.

Feststoffe müssen zur physikalischen Charakterisierung (z. B. IR-Spektroskopie) und zur quantitativen analytischen Bestimmung (z. B. im RIA) frei von Wasser und organischen Lösungsmitteln sein. Wir verwendeten dazu eine evakuierte, beheizbare Trockenpistole. Als Trocknungsmittel bewährte sich Phosphor-(V)-Oxid, das eine hohe Trocknungskapazität vor allem für Wasser und Alkohol besitzt.

2.2.2.4. Analytische Methoden

Zusätzlich zur Trennung setzten wir die Dünnschichtchromatographie auch zur Identifizierung von Substanzen ein, d. h. z. B. durch Vergleich der Laufeigenschaften einer Substanz mit der einer Referenzsubstanz, die schon anderweitig charakterisiert wurde. Mit der DC ließen sich auch unter Vorbehalt semiquantitative Aussagen über mehrere Syntheseprodukte sagen, da bei geringer Konzentration keine oder eine schwache Löschung im UV-Licht und bei hoher Konzentration eine starke Löschung oder eine "Schwanzbildung" zu sehen war.

Die Infrarot-Spektroskopie (IR) (67) war für den chemischen Aufgabenteil die wichtigste Bestimmung physikalischer Eigenschaften organischer Verbindungen, nämlich als Beweis für die Selektivität und Richtigkeit der Umsetzungen bzw. Präparationen.

Die Energie der meisten Molekülschwingungen liegt im IR-Bereich des elektromagnetischen Spektrums mit einer Wellenzahl von $4000 - 667 \text{ cm}^{-1}$. Infrarotes Licht wird adsorbiert, wenn ein infolge einer Molekülschwingung sich änderndes Dipolmoment mit dem schwingenden elektrischen Vektor des Lichts in Wechselwirkung tritt. Eine einfache Regel erlaubt zu entscheiden, wann diese Wechselwirkung und damit Lichtadsorption eintritt: Das Dipolmoment des Moleküls muß in einem Extrem der Schwingung verschieden sein von dem im anderen Extrem der Schwingung. Die Tatsache, daß viele funktionelle

Gruppen durch ihre charakteristischen Schwingungsfrequenzen identifiziert werden können, macht die IR-Spektroskopie zum einfachsten, schnellsten und dabei häufig zuverlässigsten Mittel, um eine Substanz ihrer Verbindungsklasse zuzuordnen.

Das Spektrometer besteht aus einer Lichtquelle, die den gesamten Frequenzbereich des Instruments emittiert. Diese Strahlung wird in zwei Lichtbündel gleicher Intensität aufgeteilt, von denen eines durch die zu messende Probe tritt. Wenn eine Schwingungsfrequenz der Moleküle in der Probe in den Bereich des Instruments fällt, können die Moleküle Energie dieser Frequenz aus dem Licht absorbieren. Das Spektrum wird deshalb durch Vergleich der Intensitäten der beiden Lichtbündel aufgenommen, nachdem eines die Probe passiert hat. Die Wellenlänge wird dabei auf gewöhnliche Weise mit Hilfe eines Prismas oder Gitters variiert. Die ganze Operation wird automatisch so ausgeführt, daß die Banden auf dem Spektrum nach unten zeigen, d.h. Absorption gegen Wellenlänge oder -zahl aufgetragen ist. Es ist möglich, Verbindungen in der Gasphase, als reine Flüssigkeit, in Lösung und im festen Zustand zu messen. Wir haben unsere Festsubstanz mit der 200-fachen Menge Kaliumbromid zerrieben und die Mischung mit einer hydraulischen Presse in einer geeigneten Form zu einer Pille gepreßt, die in das Spektroskop eingesetzt wurde.

Ein komplexes Molekül besitzt eine große Zahl von Schwingungsmöglichkeiten, an denen das gesamte Molekül

teilnimmt. Jedoch sind einige dieser Schwingungen in erster Näherung auf Einzelbindungen oder funktionelle Gruppen (lokale Schwingungen) beschränkt, während andere als Schwingungen des ganzen Moleküls aufgefaßt werden müssen. Viele lokale Schwingungen dienen der Identifizierung von funktionellen Gruppen.

Durch Ablesen an entsprechenden Tabellen (84) und durch Vergleich mit anderen Steroiden wie Testosteron (siehe 2.3.3.) konnten wir eindeutig zuordnen, welche Bande im IR-Spektrum der C = O-Gruppe bei C₃ und welche der bei C₂₀ entspricht.

2.3. Synthese eines Cortisol-3-(O-Carboxymethyl)Oxims (CMO)

2.3.1. Vorversuche

Die Voraussetzung für unsere Aufgabenstellung war ein reines Cortisol-C₃-Derivat (siehe 2.1.). Ausgehend davon untersuchten wir verschiedene Literaturvorschriften zur Kopplung auf ihre Brauchbarkeit. Prinzipiell sind zwei Wege beschrieben, ein reines Cortisol-3-CMO zu erhalten. Zum einen eine Reaktion über eine Enaminbildung mit anschließender CMO-Umsetzung, zum anderen eine direkte CMO-Umsetzung.

2.3.1.1. Reaktion über Enaminbildung

Der wesentliche Punkt dieser Vorschrift (40) ist die Vorstellung, daß die C_3 -Ketogruppe von Steroiden mit 3,20 Dionen selektiv mit einem sekundären Amin wie Pyrrolidin reagieren kann und daß das entstandene Enamin mit CMO selektiv am C_3 zu einem Oxim reagieren soll (siehe Abb. 3).

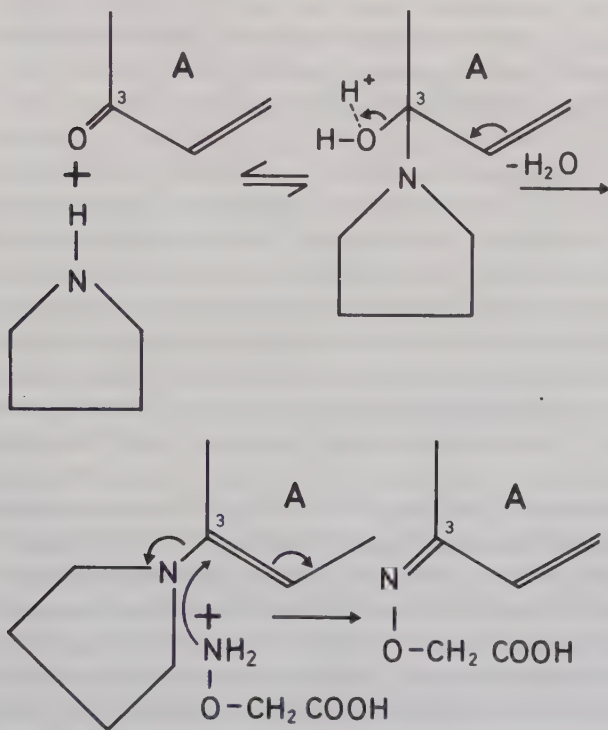


Abb. 3: Enaminbildung am $C_3=O$ des steroiden A-Ringes des Cortisols (s. Abb. 1) mit anschließender Oximbildung

oben: Umsetzung mit Pyrrolidin zum Enamin
unten: Umsetzung mit CMO zum Oxim

Die Methode geht auf eine Vorschrift aus dem Jahre 1953 zurück, die die selektive Enaminbildung beschreibt. (33). Die verschiedenen Steroide werden 1 bis 5 Stunden mit Pyrrolidin unter Rückflußkühlung erhitzt. Demgegenüber soll sich das Enamin nach der neueren Vorschrift (40) bereits nach 5 Minuten mit dem vierfachen Überschuß an Pyrrolidin gebildet haben und nach weiteren 5 Minuten unter Reflux bei 50 - 60°C mit dem doppelten Überschuß von CMO das selektive 3-CMO-Derivat.

Laut Vorschrift (40) fällt das Enamin als gelbes Präzipitat aus, das sich nach CMO-Zugabe unter Verschwinden der Färbung wieder löst. Diese Beobachtung konnte trotz zahlreicher Wiederholungen und Modifikationen der Vorschrift nicht beobachtet werden. Für das Cortisol wird eine Ausbeute nach drei Umkristallisierungen von 28 % angegeben. Als Beweis der Umsetzung wird ein Schmelzpunkt angegeben, der unter dem des Cortisols liegt. Dieser findet sich aber auch, wenn das Cortisol verunreinigt oder feucht ist. Es ist also die Schmelzpunkterniedrigung kein Beweis für eine Umsetzung und schon gar nicht für eine selektive von Cortisol zum 3-CMO-Cortisol. Zusätzlich gibt der Autor die gefundenen Werte für die C-H-N-Analyse an. Die Wasserstoffatome bringt er nur in grobe Übereinstimmung mit den kalkulierten Werten, indem er in das Cortisol-Derivat, im Gegensatz zu den anderen Steroiden, die er untersuchte, 2 Mole Kristallwasser postuliert. Die Analyse läßt ebenfalls keinen Schluß auf die Selektivität der Umsetzung zu. Kritisch ist auch die Tatsache, daß das

CMO im doppeltem Überschuß eingesetzt wird. Wir wissen aus eigenen Untersuchungen, daß unter Reflux (siehe oben) die Ketogruppen bei Überschuß von CMO an C₃ und C₂₀ reagieren.

2.3.1.2. Direkte Umsetzungen

Eine Vorschrift wird für Testosteron (24) angegeben, die wir für Cortisol einsetzten (Abb. 4). CMO wird im 2,5-fachen Überschuß zugesetzt, pro mmol Steroid werden 64 ml Lösungsmittel (Äthanol/NaOH) benötigt. Die Reaktion läuft 1,5 Stunden unter Reflux. Die Ausbeute wird nach Reinigung durch Ausschütteln mit 68 % angegeben. Als Beweis der Umsetzung wird unter anderem Schmelzpunkt und Analyse angegeben (siehe 2.3.1.1.). Für Cortisol ergibt sich bei Einsatz dieser Methode nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung (siehe 2.2.2.2., 2.2.2.4.) und späterer IR-spektroskopischer Untersuchung ein Produktgemisch aus an C₃, C₂₀ und C₃₋₂₀ umgesetzten Derivaten.

Eine weitere Literaturstelle bezieht sich direkt auf das Cortisol (25). CMO wird hierbei in 3,5-fachem Überschuß zugegeben, pro mmol Steroid werden etwa 35 ml Lösungsmittel (Methanol, NaHCO₃) benötigt und die Reaktionszeit beträgt 20 Minuten bei Zimmertemperatur. Nach Ausschütteln und Umkristallisieren wird die Ausbeute mit 39 % angegeben. Als "Beweis" für die selektive Umsetzung wird ein Schmelzpunkt angegeben, der dem des nicht umgesetzten Cortisols entspricht, zusätzlich unzureichende UV- und Massenspektrometersdaten. Nach unseren

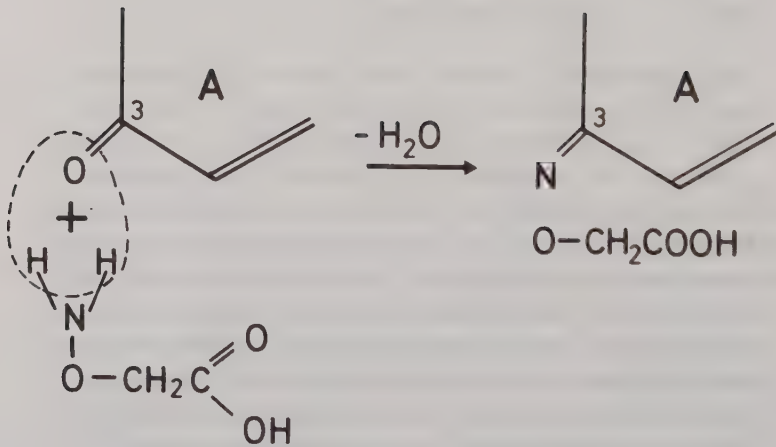


Abb. 4: Oximbildung

Umsetzung des Cortisols ($\text{C}_3=\text{O}$) mit CMO

Untersuchungen erfolgt in einem Zeitraum zwischen 20 Minuten und 3 Tagen keine Umsetzung, wie Dünnschichtchromatogramme ergaben. Durch die Reinigungsprozeduren holte man lediglich reines Cortisol aus dem Ansatz.

2.3.2. Methodik

Aufgrund der langfristigen insgesamt enttäuschenden Vorversuche waren wir gezwungen, einen neuen Syntheseweg zu entwickeln.

2.3.2.1. Lösungsmittel

Das Lösungsmittel ist einer der wichtigsten Parameter einer Reaktion. Die Ausgangssubstanzen müssen darin gut löslich sein, damit durch das Arbeiten mit hohen Konzentrationen die Reaktionsgeschwindigkeit bzw. -wahrscheinlichkeit erhöht wird. Das CMO, das als Hemihydrochlorid vorliegt, muß erst durch ein alkalisches Lösungsmittel aus seiner Bindung freigesetzt werden. In unseren Vorversuchen wurde 1 mmol Cortisol in 30 - 50 ml Äthanol oder Methanol gelöst, das CMO in NaOH. Beim Zutropfen der CMO-in die Cortisol-Lösung fiel das CMO meist aus und konnte nur durch nochmalige Zugabe von NaOH wieder in Lösung gebracht werden. Bei einer Reaktion wie der Oximbildung, bei der Wasser frei wird, wird das Gleichgewicht sicherlich nicht in Richtung Endprodukt verschoben, wenn in wässrigem Lösungsmittel gearbeitet wird.

Zur CMO-Freisetzung verwendeten wir daher trockenes Pyridin, ein tertiäres Amin, also eine organische Base mit einer Dichte von 0,98 g/ml und einem Molekulargewicht von 79,1 (Abb. 5), das die Reaktion katalysiert (siehe Abb. 5).

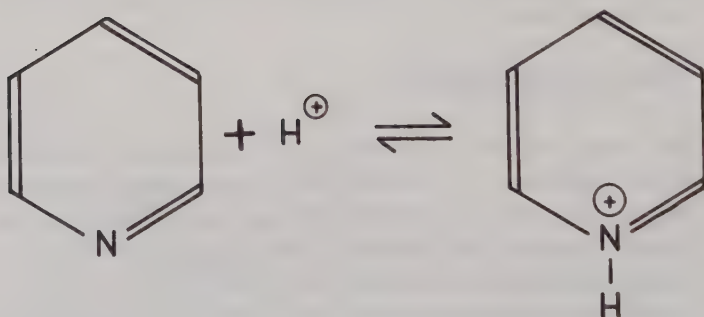


Abb. 5: Die Strukturformel des Pyridins

Da sich auch das Cortisol, das wir in Vorversuchen in Dioxan gelöst hatten, sehr gut in Pyridin löst, kamen wir mit 2 ml Lösungsmittel pro mmol Ansatz aus. Um das Gleichgewicht auf die Produktseite zu verschieben, fügten wir noch Molekularsieb (4 Å Porengröße für Wasser) hinzu.

2.3.2.2. Einfluß der Temperatur und der molaren Verhältnisse

Die Ketogruppe am C_3 des A-Ringes (siehe Abb. 1) ist aus sterischen Gründen reaktiver als die an der C_{20} -Stelle, die von polaren Hydroxylgruppen an C_{17} und C_{21} flankiert ist. Dies gilt aber nur für niedrige Reaktionstemperaturen.

Wir untersuchten die CMO-Kopplung an Cortisol (siehe 2.3.1.2.) bei $10 - 15^{\circ}\text{C}$, bei Zimmertemperatur und bei $50 - 60^{\circ}\text{C}$ hinsichtlich der Selektivität und der Reaktionsdauer. Mittels der semiquantitativen Kieselgel-dünnschichtchromatographie (siehe 2.2.2.4.) wurde das Versuchsergebnis kontrolliert. Die Reaktion bei $50 - 60^{\circ}\text{C}$ lief mit etwa 1 Stunde am schnellsten ab. Sie verfügte aber über zwei erhebliche Nachteile:

1. Es entstanden alle möglichen Reaktionsprodukte etwa in gleicher Menge, nämlich am C_3 , am C_{20} bzw. doppelt umgesetzt.
2. Offensichtlich zersetzten sich in der Hitze diese Reaktionsprodukte, denn es werden zusätzliche Reaktionsprodukte nachgewiesen, die dünnschichtchromatographisch oberhalb, d. h. vor dem Cortisol liegen (siehe Abb. 2), während die C_3 - bzw. C_{20} -Reaktionsprodukte unterhalb, d. h. hinter dem Cortisol liegen.

Die Reaktion bei $10 - 15^{\circ}\text{C}$ dauerte mindestens 2 Tage und führte zu keiner besseren Selektivität als die bei Zimmertemperatur, die schon nach 6 Stunden abgeschlos-

sen ist und eine hohe C_3 -Selektivität aufweist. Hierbei wurde CMO nur in äquimolarer Menge zugesetzt, damit es möglichst nur am C_3 reagiert. Dafür mußte in Kauf genommen werden, daß das Cortisol in Spuren nicht umgesetzt wurde. Dieses kann aber leichter entfernt werden und stört zudem bei Antigen- und Tracerherstellung weniger als ein umgesetztes C_{20} -Derivat. Das CMO wird dagegen vollständig umgesetzt, was die Reinigung erheblich erleichtert.

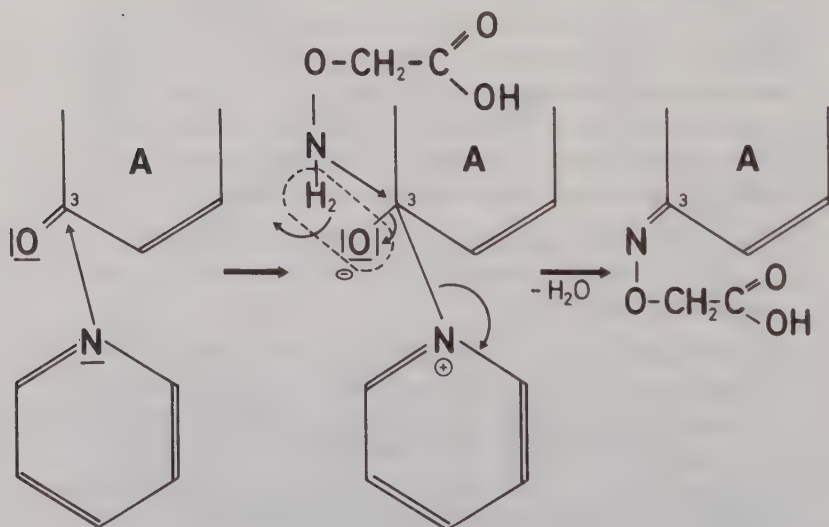


Abb. 6: Cortisol-CMO-Umsetzung unter
"Pyridinkatalyse"

2.3.2.3. Umsetzung unter Pyridinkatalyse

Der Ablauf der Reaktion unter Pyridinkatalyse (siehe Abb. 6) ist zusammengefaßt folgender: Wir pipettieren in einen Schliffkolben eine definierte Menge Tritium-Cortisol als Tracer. Das Lösungsmittel wird im Rotationsverdampfer abgezogen (siehe 2.2.2.3.),

In das gleiche Gefäß gibt man 1 mmol Cortisol, von dessen Reinheit man sich vorher durch DC-Kontrolle überzeugt hat (siehe 2.2.2.2.), und löst es unter Rühren in 1 ml Pyridin. Dieser Vorgang ist intensiv durchzuführen, um das Tritium-Cortisol, das an der Gefäßwand adsorbiert, vollständig in Lösung zu bringen. Gleichzeitig löst man 1 mmol CMO, das als Hemihydrochlorid vorliegt (Molekulargewicht ist durch 2 zu dividieren!), ebenfalls in 1 ml Pyridin. Diese Lösung pipettiert man in den Schliffkolben, fügt mehrere Spatelspitzen Molekularsieb (Kieselgel) 4 Å Porengröße hinzu, verschließt das Gefäß mit einem mit Kieselgel gefüllten Trockenrohr und rührt die Lösung bei Zimmertemperatur. Unter DC-Kontrolle beobachtet man das langsame Verschwinden der Cortisollöschung und das Entstehen einer neuen polaren Löschung der UV-Fluoreszenz. Nach etwa 6 Stunden ist die Reaktion beendet.

2.3.2.4. Reinigung

Das Pyridin wird schonend im Rotationsverdampfer bei 30 - 40°C abgezogen und das Produkt in etwas angesäuertem Dioxan gelöst, welches ebenfalls abgezogen wird. Dieser Vorgang wird so oft wiederholt, bis das Pyridin im DC nicht mehr nachweisbar ist. Das Produkt besteht in erster Linie aus Cortisol-3-CMO, mit Spuren von nicht umgesetztem Cortisol und am C₂₀ und doppelt umgesetztem. Die Testosteron-Präparation, die wir nebst anderen Steroiden ebenfalls durchführten, schlossen wir hier ab, da dieses Steroid nur über eine Ketogruppe verfügt und somit kein Gemisch entstehen kann. Die Ausbeute für das Testosteron ist quantitativ.

Das Cortisolprodukt wird in 1 ml angesäuertem Dioxan gelöst und mit einer ausgezogenen Pipette auf eine 2 mm dicke präparative Kieselgeldünnschichtplatte aufgetragen. Zur besseren Auftrennung (Isomerentrennung) verwendete man für 1 mmol Cortisol-Derivat etwa 10 Platten (siehe 2.2.2.2.).

Nach dem Auftrennen werden die Platten mit einem Föhn sorgfältig getrocknet und die einzelnen Banden unter UV-Licht mit einem Bleistift markiert. Durch IR-Untersuchung wissen wir, daß das C₃-Derivat dem Cortisol folgt. Diese Bande wird mit einem Spatel von der Platte gekratzt. Mehrmals, wegen der Dauer am besten über Nacht, löst man das C₃-Derivat abwechselnd mit Dioxan und dem Laufmittel vom Kieselgel, das mit einer Fritte abgetrennt wird, und rotiert dann das Lösungsmittel ab. Die

gereinigte Substanz trockneten wir über Nacht in der Trockenpistole über Phosphor-V-Oxid (siehe 2.2.2.3.) und untersuchten sie dann im IR (siehe 2.2.2.4.) auf ihre Reinheit und Selektivität. Die Ausbeute für das Cortisol betrug zwischen 60 und 70 %.

Wegen der schlechten Kristallisationsfähigkeit des Derivats gelang ein Umkristallisieren zur weiteren Reinigung nicht. Die in der Literatur (24, 25, 40) angegebenen Vorschriften führten auch nach Wochen zu keinem brauchbaren quantitativen Resultat.

2.3.3. Ergebnisse

Sowohl mit Cortisol als auch mit Cortisol-3-CMO wurden Eichkurven erstellt (siehe 2.8.2.7.). Bei der Cortisolkurve lag der 50 % Intercept (siehe 2.8.2.9.) bei 5 µg%, bei der Haptenkurve bei 3 µg%. Die Erklärung mag darin liegen, daß wir ein Antiserum gegen das Hapten bzw. gegen ein an TG gekoppeltes Hapten haben und nicht gegen Cortisol.

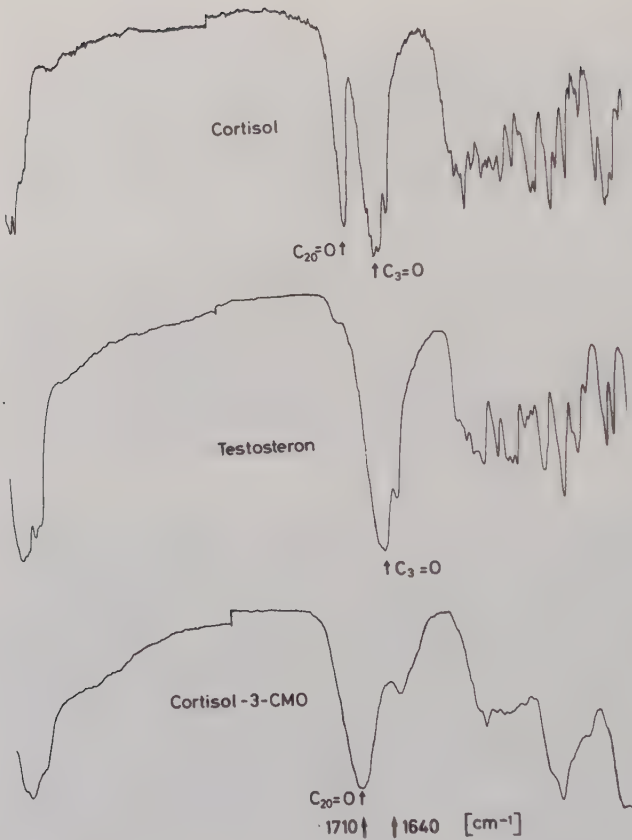


Abb. 7: Infrarotspektrenausschnitte

Cortisol, Testosteron, Cortisol-3-CMO
Mit Pfeilen gekennzeichnet sind die Banden
($1640, 1710\text{ cm}^{-1}$), die die $C_3=O$ - bzw.
 $C_{20}=O$ -Gruppen charakterisieren.

Abb. 7 zeigt die IR-Spektrenausschnitte von Cortisol, Testosteron und Cortisol-3-CMO (siehe 2.2.2.4.). Die Pfeile kennzeichnen die jeweilige Carboxylgruppe, beim Cortisol etwa bei 1710 und 1640 cm^{-1} , beim Testosteron nur bei 1640 cm^{-1} . Das Testosteron verfügt nur über eine am C_3 , somit erfolgt leicht eine Zuordnung der jeweiligen Bande zur dazugehörigen Ketogruppe. Beim Cortisol-3-CMO ist die Bande, die die C_{20} -Ketogruppe charakterisiert, noch völlig erhalten, die bei 1640 cm^{-1} (C_3) aber verschwunden.

2.4. Antigenherstellung

Das Cortisol-3-CMO war nur ein Zwischenprodukt zur Antigen- und Tracerherstellung. Es muß zur Antigenherstellung an ein Trägerprotein bzw. zur Tracerherstellung an eine phenolische Aminosäure gekoppelt werden. Zu dieser Peptidsynthese gibt es unter anderem zwei Reaktionen, die CDI- (14) und die Gemischte Anhydrid-Methode (23). Ohne die Carboxylaktivierung mit diesen zwei Methoden würde es nicht zu einer Peptidbindung, sondern zur Salzbildung kommen:



2.4.1. Methodik

2.4.1.1. Carbodiimid-Reaktion

Die Reaktion wird am Beispiel der Kopplung des Cortisol-Derivates an Thyreoglobulin gezeigt. Beschrieben wird ein Ansatz, der zur Immunisierung von sechs Kaninchen ausreicht.

Man löst 10 μmol Cortisol-3-CMO in 1 ml Dioxan und versetzt die Lösung tropfenweise mit 1 ml $\text{H}_2\text{O}/\text{HCl}$ pH = 5,5. Mit einem Spatel fügt man CDI hinzu (20 mg/ml Gesamtansatz) und läßt dann den Ansatz rühren bis alles gelöst ist (ca. 5 Minuten). In der Zwischenzeit löst man 0,1 μmol TG/4 (= Untereinheit des Thyreoglobulins) in 1 ml H_2O pH = 5,5, das man dann dem Ansatz langsam zutropft und mit diesem 20 Stunden schüttelt (siehe Abb. 8). Wichtig ist es, in der ersten Stunde den pH-Wert laufend zu kontrollieren und ihn bei pH = 5,5 zu halten. Im Alkalischen zersetzt sich CDI zu Harnstoff und die Reaktion kann dann nicht mehr weiterlaufen.

Nach Beendigung der Reaktion stellt man den pH-Wert auf 7 bis 8 ein und pipettiert 3 ml einer 1 M Hydroxylaminhydrochlorid-Lösung dazu, um restliches CDI durch Guanidin-Derivatbildung zu zerstören. Nach einer weiteren Stunde trennt man das Thyreoglobulin durch Dialyse von den übrigen Substanzen ab (siehe 2.2.2.3.).

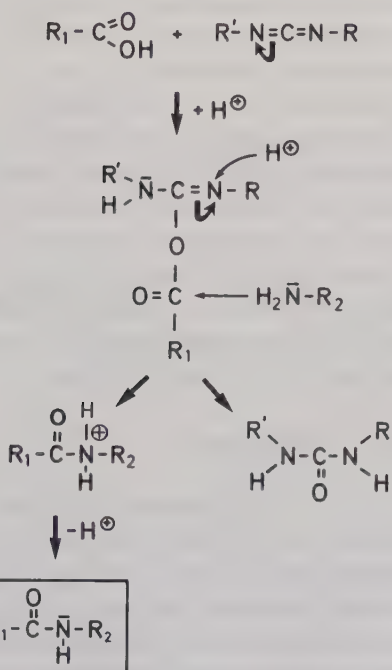
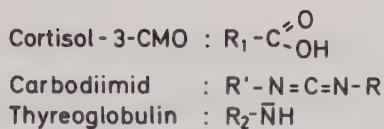


Abb. 8: Carbodiimid-Aktivierung:

Kopplung des Cortisol-3-CMO an Thyreoglobulin

2.4.1.2. Gemischte Anhydrid-Reaktion

Beschrieben wird ein Ansatz zur Kopplung des Cortisol-Derivates an Thyreoglobulin, mit dem sich sechs Kaninchen einmal immunisieren lassen.

Wir lösten 0,1 μmol TG in möglichst wenig gesättigter Natriumbikarbonatlösung $\text{pH} = 8,5$ sowie 10 μmol Cortisol-3-CMO in 1 ml Dioxan mit 20 μmol Triäthylamin. Beide Lösungen werden auf $5 - 10^\circ\text{C}$ abgekühlt. Zur letzteren gibt man 11 μmol Chlorameisensäureisobutylester und rührt 20 Minuten bei $5 - 10^\circ\text{C}$. Es bildet sich das "gemischte Anhydrid". Zu diesem tropft man langsam die abgekühlte TG-Lösung und läßt dann die Reaktionslösung mindestens 16 Stunden rühren (siehe Abb. 9). Nach Beendigung der Reaktion reinigt man das gekoppelte TG durch Dialyse (siehe 2.2.2.2.).

2.4.2. Ergebnisse

Durch Einsatz von ^3H -Cortisol-3-CMO (siehe 2.3.2.1.) konnte man nach Zählratenvergleich mit ^3H -Cortisol-TG-Lösungen bekannter Molarität und durch Vergleich zweier Ansätze mit und ohne Aktivierung mittels Carbodiimid- bzw. gemischter Anhydrid-Methode bei beiden Methoden aussagen, wieviel Mol Cortisol spezifisch bzw. unspezifisch gekoppelt waren:

Bei der CDI-Methode wurden spezifisch 5 (4 - 6) und unspezifisch 2 und bei der gemischten Anhydrid-Methode spezifisch 20 und unspezifisch ebenfalls 2 Mol Cortisol-Derivat pro Mol Untereinheit bTg gekoppelt.

Triäthylamin : $\text{Et}_3\bar{\text{N}}$

Chlorameisensäure-

Cortisol-3-CMO : $\text{R}-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$

isobutylester: $\text{R}_1-\text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{Cl}$

Thyreoglobulin : $\text{R}'-\bar{\text{N}}\text{H}_2$

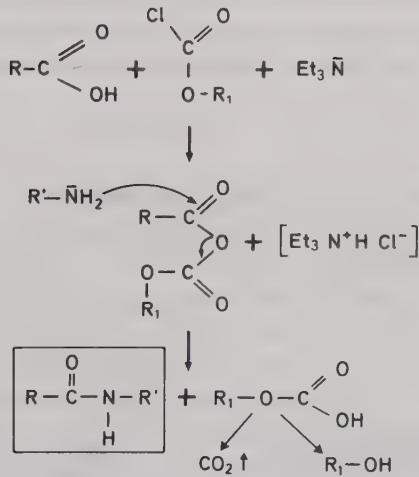


Abb. 9: Gemischte Anhydrid-Reaktion

Kopplung des Cortisol-3-CMO an Thyreoglobulin

Die CDI-Methode ist noch mit anderen Nachteilen behaftet. Die Reaktion kann nur im Sauren stattfinden. In diesem Milieu ist aber das Cortisol-Derivat nur sehr schwer löslich. Deshalb ist es möglich, daß es statt zur Carboxylaktivierung zu einer Guanidinderivatbildung kommt (siehe Abb. 10). Weiterhin ist es möglich, daß es innerhalb eines bzw. zwischen den Trägerproteinen zu Interaktionen (56) kommt. Wir haben festgestellt, daß das mittels CDI gekoppelte TG sehr schwer wieder in Lösung zu bringen ist, da es sehr "klumpt".

Carbodiimid : $R'-N=C=N-R$

Thyreoglobulin : R_2-NH_2

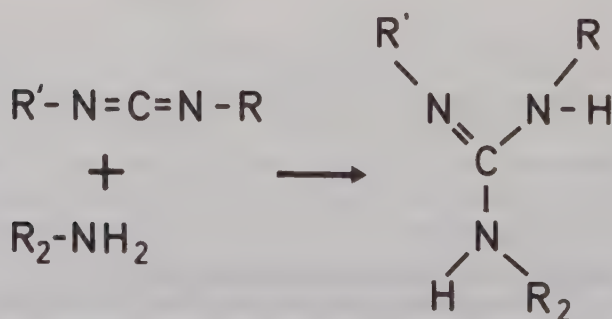


Abb. 10: Guanidinderivatbildung

2.5. Tracerherstellung

2.5.1. Methodik

Zur Markierung bevorzugten wir die sogenannte Zweiphasen-Methode (siehe 2.5.1.2.3.), d. h. zuerst stellt man ein markierbares Derivat her, das anschließend in einer zweiten Reaktion jodiert wird. Von den zur Verfügung stehenden Aminosäurederivaten verwendeten wir Tyramin und Tyrosinmethylester (TME).

2.5.1.1. Derivatbildung

Aufgrund der Nachteile der CDI-Methode (siehe 2.4.2.2.) koppelten wir nur mit der gemischten Anhydrid-Methode. Im Gegensatz zu 2.4.1.2. setzten wir das Aminosäurederivat in mindestens doppeltem molaren Überschuß ein und lösten es, da es als Hydrochlorid vorliegt, wie das Cortisol-Derivat in Pyridin. Wir testeten auch zwei Varianten mit gleichem Erfolg:

Das Steroidderivat wird in Dioxan und Triäthylamin (3 : 1, v/v) gelöst, das AS-Derivat einmal in Dioxan: H₂O mit 0,1 n NaOH auf pH = 8,5 eingestellt (3 : 1, v/v) zum anderen in Dioxan und Triäthylamin (3 : 1, v/v). Gereinigt wird das Produkt durch Ausschütteln (s.2.2.2.2.). Anschließend wird das Lösungsmittel abgezogen (siehe 2.2.2.3.) und die Substanz in der Trockenpistole getrocknet (siehe 2.2.2.3.). Aufbewahrt wird sie bei -20°C.

2.5.1.2. Markierung

2.5.1.2.1. Prinzip

Bei der Markierung wird radioaktives Na-Jodid durch die Zugabe von Chloramin T, einem Oxydationsmittel, zu freiem Jod oder Jodonium-Ionen (J^+) (3) oxidiert und in die phenolischen Ringe der Cortisol-Derivate (siehe 2.5.1.1.) eingefügt. Die anschließende Zugabe von Natriummetabisulfit führt wieder zur Reduktion der überschüssigen Jod-Kationen und damit zum Abbruch der Reaktion.

Nach der Markierung muß der Tracer vom freien Jodid und entstandenen Bruchstücken abgetrennt werden.

2.5.1.2.2. Markierungsablauf

Wir lösen kurz vor der Markierung 1 mg Cortisol-3-CMO-TME in 1 ml Dioxan und fügen tropfenweise 4 ml 0,5 M Na-Phosphat-Puffer pH=7,4 hinzu (0,2 mg/ml). Danach wird Chloramin T und Na-Metabisulfit in Phosphatpuffer gelöst, jeweils in einer Konzentration von 2 mg/ml. In ein Reaktionsgefäß, einem silikonisierten Spitzglas, pipettiert man in folgender Reihenfolge:

20 µl Steroidderivat (4 µg)

20 µl Na ^{125}J in Phosphatpuffer (1,5 mCi)

20 µl CT (40 µg)

und nach 2 Minuten Reaktionszeit (schütteln!)

40 µl Na-Metabisulfit (80 µg)

Anschließend erfolgt sofort eine Vorreinigung:
100 μ l H_2O und 200 μ l EE werden ins Gefäß pipettiert,
nach Schütteln und Phasentrennung wird die EE-Phase
abgehoben und die Vorreinigung noch einmal wiederholt.
Dabei bleiben die Salze im Wasser und das Produkt
geht in den EE.

2.5.1.2.3. Vorversuche zur Markierung

Für die Markierung erprobten wir mehrere Reaktions-
gefäße, nämlich Eppendorfgefäße, silikonisierte Eppen-
dorfgefäße, Glasgefäße und silikonisierte Glasgefäße
und erzielten bei den letzteren die geringste Wandad-
sorption. Eine Literaturstelle (2) beschrieb eine Mar-
kierung, bei der das Cortisolderivat in EE gelöst war,
und die zwei Phasen während der Jodierung durch konti-
nuierliches Schütteln vermischt wurden. Wir sahen darin
keinen Vorteil und übertrugen es nicht auf unser System.

Generell gibt es in der Literatur (1, 2, 3, 45, 59, 68)
Unterschiede in der Menge der verwendeten Reagenzien:
So schwankt das Verhältnis Steroidderivat zu mCi $Na^{125}J$
von 0,6 - 4 mg : 1 mCi, das Verhältnis Steroidderivat zu
CT von 1 mg : 4 - 10 mg und die Reaktionszeit von 30 sec
bis 3 Minuten. Durch Ausprobieren erhielten wir die Wer-
te für unseren Markierungsablauf.

Ein Teil der Literaturangaben beschreibt die sogenannte
Einphasenmarkierung (31, 45), die wir ebenfalls unter-
suchten. Dabei wird zuerst die phenolische Aminosäure
mit CT markiert und sofort danach erfolgt die Kopplung

ans Steroid-Derivat mit der gemischten Anhydrid-Methode (siehe 2.4.1.2.). Der Vorteil ist, daß der eventuell schädigende Einfluß des Oxidationsmittels auf die Steroidverbindung wegfällt und daß die Literatur eine spezifische Aktivität bei dieser Methode angibt, die um den Faktor 10 höher liegt als bei der Zweiphasenmethode. Wir konnten bei unseren Vorversuchen dieses Ergebnis nicht reproduzieren. Die Nachteile sind, daß diese Methode sehr arbeitsintensiv ist, da bei jeder Markierung auch eine Kopplung stattfinden muß. Bindet der Tracer einmal nicht bzw. schlecht, weiß man nicht, ob es an der Jodierung oder an der Kopplung lag. Neben der höheren Arbeitsintensität und den größeren Fehlerquellen ist auch die Kontaminationsgefahr größer, weil über einen sehr langen Zeitraum mit der hohen Radioaktivität weitergearbeitet werden muß. Weiterhin ist es denkbar, daß diese zu einer "Zerstrahlung" des Moleküls führt.

2.5.1.2.4. Reinigung

Die EE-Phase wird auf 2 Alu-Kieselgeldünnschichtplatten mit 0,2 mm Schichtdicke dünn aufgetragen und dann mit folgendem Laufmittel getrennt: EE : ES : H₂O = 9 : 1 : 0,1. In der Literatur (2) wird noch ein anderes angegeben, das unserer Meinung nach zwar sehr schonend, dafür aber nicht so gut auftrennt: Chloroform : Methanol : Wasser = 9 : 1 : 0,1. Noch vorhandenes Jodid und markiertes, aber freies Amin bleiben am Start liegen. Nach Föhntrocknung werden schmale Streifen von höchstens 0,5 cm Breite ausgeschnitten und gezählt. Streifen mit hoher Aktivität

werden aufbewahrt und einzeln weiter verarbeitet. Das Kieselgel wird von den Alustreifen mit einem Spatel gekratzt und in einen Schliffkolben gegeben. Die Aktivität wird mehrere Male sorgfältig mit EE eluiert. Mit geringerem Erfolg wurden Äthanol, Methanol und Dichlormethan getestet. Nach dem Einrotieren füllt man das Gefäß mit Puffer (siehe unten) auf und schüttelt es über Nacht.

Zur Überprüfung des Markierungserfolges werden die maximale und unspezifische Bindung jeder Fraktion bei hoher Konzentration des spezifischen Antiserums (bei uns 1 : 1000) bestimmt. Die zu verwendende Fraktion sollte zumindest eine maximale Bindung von 90 % und eine unspezifische Bindung von 5 % aufweisen. Ist dies bei keiner der Fall, werden die bindenden Fraktionen noch einmal chromatographisch getrennt. Der auf 20 000 cpm / 100 µl verdünnte Tracer wird portioniert und bei -20°C bis zum Gebrauch eingefroren.

Zur Verdünnung des Tracers wurde ein 0,1 M Na-Citratpuffer pH = 4 (siehe 2.8.2.1.2.) verwendet, da für die Cortisolmethode (siehe 2.8.2.7.) ein saurer Puffer notwendig ist. Wegen der hohen Wandadsorption, die wir als Erniedrigung der maximalen und als Erhöhung der unspezifischen Bindung feststellten, gaben wir dem Puffer Eiweiß bei. Durch Ausprobieren fanden wir als ideale Kombination 0,25 g% Gelatine und 0,25 g% BSA. Eine Erhöhung der Gelatinekonzentration führte, vor allem bei niedrigen Temperaturen, zu einem Gelieren des Puffers. Den Rest des "Eiweißbedarfs" füllten wir deshalb mit

BSA auf. Wichtig dabei ist es, eine steroidfreie Charge zu verwenden, weil sich sonst die Empfindlichkeit und Maximalbindung des Assays verschlechtert. Die Gelatine bekommt man am besten dadurch in Lösung, daß man den Puffer erwärmt und vorsichtig rührt.

2.5.1.2.5. Vorversuche zur Reinigung

Zur Reinigungsoptimierung wurde auch die Säulentrennung eingesetzt. Wir verwendeten eine 20 ml Sephadex G 10- und eine 20 ml Sephadex LH 20-Säule. Beides sind Dextran-Gele. G 10 hat eine Ausschlußgrenze von etwa 700 Molekulargewicht und LH 20 von 5000. G 10 ist sehr hydrophil und quillt in Wasser. LH 20 verfügt über hydrophile und lipophile Gruppen und quillt auch hervorragend in organischen Lösungsmitteln (21, 55).

Die G 10-Säule wurde mit Puffer II (siehe 3.2.1.) äquilibriert und auch eluiert. Es erschienen 3 nicht-bindende radioaktive Peaks, die wir durch Vergleich mit anderen Markierungen als Albumin-, Jodid- und Tyramin-Peak identifizierten. Die meiste Aktivität blieb auf der Säule. Nachdem 1 ml eines CBG-reichen Serums (nach Dexamethason-Suppression) aufgetragen wurde, kam nur ein kleiner Anteil bindender Radioaktivität von der Säule. Wir untersuchten auch den Einfluß des pH. Eluieren wir die Säule mit 1/15 M Na-Phosphatpuffer p = 11, erhielten wir einen kleinen Peak radioaktiven bindenden Materials. Nach Umpufferung mit 0,1 M Na-Citratpuffer pH = 4 konnte wieder mit dem Phosphatpuffer pH = 11 bindende Radioaktivität in kleinen Mengen eluiert werden.

Diesen Versuch setzten wir über einen ganzen Tag fort, es blieb trotzdem ein Großteil der Aktivität auf der Säule.

Ähnlich erging es uns bei der Trennung der Aktivität mit der LH 20-Säule. Eluiert hatten wir einmal mit Di-oxan und einmal mit EE. Einen Teil der Aktivität erhielten wir als sehr breiten, nicht sauber aufgetrennten Peak, der den Ansprüchen (siehe 2.5.1.2.4.) nicht genügte, der Rest blieb auf der Säule.

Aus diesem Grund wandten wir uns der DC-Tracerreinigung zu (siehe 2.5.1.2.4.).

2.5.2. Ergebnisse

Würden in unseren Versuchen die 4 µg Steroidderivat vollständig mit den 1,5 mCi jodiert, ergäbe sich eine spezifische Aktivität von 375 mCi/mg. Die Literaturangaben (45) schwanken zwischen 100 bis 500 mCi/mg. Ein Autor (45) gibt für seine Einphasenmarkierung 6200 mCi/µg an. Wir können keinen genaueren Wert angeben, da die Unsicherheit zu groß ist. Etwa 50 % der Radioaktivität gehen bei der Vorreinigung (siehe 2.5.1.2.2.) verloren. Wir wissen nicht, ob es sich nur um Jodid handelt, da wir es nicht auftrennten und auf seine Bindung untersuchten. Nur die verbliebenen 50 % werden durch DC gereinigt (siehe 2.5.1.2.4.). Ein Teil der Aktivität bleibt am Start, vermutlich Jodid und freies markiertes TME, ein anderer Anteil in wechselnder prozentualer Größe läuft im DC und bindet aber nicht. Ob es irgendwelche Bruchstücke sind oder eventuell C₂₀-Derivate wissen wir nicht.

Diese von Präparation zu Präparation wechselnden Größen erlaubten es uns nicht, über die spezifische Aktivität eine exakte Aussage zu machen.

Wir markierten ein Tyramin- und ein TME-Derivat und setzten es in den Assay (siehe 2.8.2.7.) ein. Mit dem ersteren erhielten wir einen 50% Intercept (siehe 2.8.2.9.) von etwa 50 $\mu\text{g}\%$, bei dem letzteren von etwa 10 $\mu\text{g}\%$. Für den Routineassay können wir aus Empfindlichkeitsgründen nur das TME-Derivat einsetzen. Mit diesem Ergebnis befinden wir uns in Übereinstimmung mit der Literatur (2).

2.6. Reduktive Aminierung

2.6.1. Methodik und Ergebnisse

Folgende Überlegungen veranlaßten uns, nach neuen Reaktionen zu suchen: Die C_3 -Ketogruppe im Cortisol ist sterisch begünstigt. Dieser Effekt könnte vor allem dann sichtbar werden, wenn man die C_3 -Gruppe mit einem sehr großen Molekül wie z. B. Tyramin direkt umsetzt. Dies hat den zweiten Vorteil, daß man sich das CMO-Zwischenprodukt spart und in einer Reaktion ein jodierbares Produkt herstellt. Gelänge dies mit Tyrosin, könnte man dasselbe Derivat zur Antigen- und Tracerproduktion verwenden.

2.6.1.1. Leuckart-Wallach Reaktion

Nach Leuckart-Wallach (67) kann man Amine reduktiv mit Aldehyden oder Ketonen und Ameisensäure als Reduktions-

mittel alkylieren. Die Carboxylverbindung (C_3) reagiert zunächst in der üblichen Weise mit dem Amin. Das Azomothinkation (I in Abb. 11) wird nunmehr durch Ameisensäure über einen cyclischen Übergangszustand (II) zum Amin reduziert.

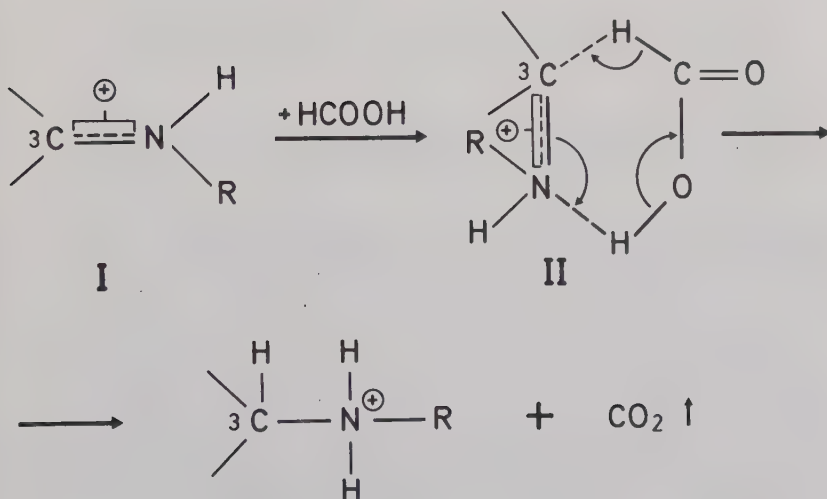


Abb. 11: Leuckart-Wallach Reaktion
(Einzelheiten im Text)

Die Aminierung von Ketonen führt man normalerweise bei Temperaturen von 150 - 180°C durch. Das Wasser muß, um die Ausbeute zu erhöhen, entfernt werden. Beim Cortisol konnten wir den Ansatz maximal nur bis 50 - 60°C erhitzen (siehe 2.3.2.2.). Wir führten drei Parallelversuche durch:

1. 1 mmol Cort + 3 mmol Tyramin in Ameisensäure
bei 50°C Reflux über Nacht mit Molekularsieb
2. 1 mmol Cort + 1,1 mmol Tyramin in Ameisensäure,
bei Zimmertemperatur über 2 Tage mit Molekularsieb
3. 1 mmol Testosteron + 2 mmol Tyramin in Ameisensäure,
bei 50°C Reflux über Nacht mit Molekularsieb.

Anfänglich schien es, daß alle drei Versuche zu einem Erfolg führten. Das Cortisol war überall umgesetzt, eine neue Substanz, die im DC sehr unpolar lief, war entstanden. Nach Reinigung, Trocknung und längerer Aufbewahrung bei -20°C stellte sich im DC heraus, daß neben der neuen Substanz wieder Cortisol vorhanden war. Bei einem Versuch, in dem wir nur Cortisol und Ameisensäure rührten, entstand auch eine Substanz, die unpolarer ist als Cortisol. Offensichtlich führte die Ameisensäure im Steroid nur zu einer reversiblen Umlagerung des Gerüsts.

2.6.1.2. Weitere reduktive Aminierung

Diese reduktive Aminierung führten wir zuerst mit Cortisol und CMO durch. Wir lösten 1 mmol Cortisol, 1 mmol CMO und 0,6 mmol des Reduktionsmittels Natriumcyanoborhydrid (NaBH_3CN) (5) im polaren Dimethylformamid (DMF). Bei Zimmertemperatur, unter Molekularsiebeinsatz, lief die Reaktion etwa drei Tage. Das entstandene Produkt lief im DC polarer als das Oxim. Nach der üblichen Reinigung (siehe 2.3.2.4.) war es im IR als am C_3 umgesetzt zu identifizieren.

Die Oximreduktion funktionierte offensichtlich problemlos. Mit einem primären Amin wie Tyramin, das wir als Hydrochlorid einsetzten, führten wir die gleiche Reaktion in DMF und Pyridin durch. Es entstand eine Substanz, die unpolarer im DC lief als Cortisol. Nach DC-Reinigung bzw. bei einem größeren Ansatz nach Kieselgelsäulenreinigung mit EE als Elutionsmittel, erhielten wir ein hydroskopisches Öl, das sich weder im Rotationsverdampfer noch im Lyophilisator noch in der Trockenpistole trocknen ließ (siehe 2.2.2.3.). Eine Identifikation durch ein Flüssigkeits-IR-Spektrum mißlang ebenfalls. Durch Paralleluntersuchungen, bei denen wir die beteiligten Reagenzien untereinander kombinierten, schlossen wir Interaktionen wie z.B. zwischen Ameisensäure und Cortisol bei der Leuckart-Wallach-Reduktion aus. Im DC zeigten sich keine Veränderungen. Das heißt, wenn z. B. das NaBH_3CN mit dem Cortisol reagieren würde, dürfte das die Polarität und die Löslichkeit in dem Laufmittel nicht beeinflussen.

1 mmol Cortisol, 1 mmol Tyramin HCl (in späteren Versuchen auch TME-HCl und Tyrosin-HCl) und 0,3 mmol NaBH_3CN wurden in Methanol gelöst und in einem Parallelversuch in Pyridin. Die Lösungen wurden mit je 400 μl 5 n HCl in Methanol (2 mmol) (siehe 2.2.2.1.) versetzt und unter Molekularsiebeinsatz bei Zimmertemperatur geschüttelt. Pyridin hatte den großen Vorteil, daß alle Substanzen sehr gut in ihm löslich sind. Das Tyrosin war nach einer Woche noch nicht ganz umgesetzt, die anderen Amine etwa nach drei Tagen. Es fielen bei allen Ansätzen große Kristalle aus, die weder in Wasser noch in organischen Lösungsmitteln löslich waren, im DC überhaupt nicht liefen und sich somit nicht identifizieren ließen. Die Ansätze wurden daher nach Beendigung der Reaktion 1 Stunde mit Wasser gerührt, um gebildete Boratkomplexe zu zerstören. Das Lösungsmittel wurde abgezogen, die weiße kristalline Substanz in der Trockenpistole getrocknet. Im DC verhielt es sich polarer als Cortisol und war nur als eine einzige Substanz zu erkennen. Im IR-Spektrum war eine Aussage, vor allem in Hinblick auf die Stelle der Kopplung, nicht möglich, weil die Cortisol-schwingungen von den Aromatschwingungen überlagert wurden. Im Cortisol-RIA (siehe 2.8.2.7.) verhielt sich diese neue Substanz immunoreaktiv, d. h. der Tracer wurde im Assay verdrängt.

2.6.2. Zusammengefaßte Ergebnisse

Das Ziel dieser Reaktion war es, ein stabiles Derivat (Cortisol-3-Tyrosin) herzustellen, das sowohl zur Markierung als auch zur TG-Kopplung geeignet war.

Das Cortisol-3-CMO haben wir reduziert (siehe 2.6.1.2.), es verhält sich aber bei gleichen IR-Daten im DC polarer als das nicht reduzierte. Zur Markierung kann es direkt natürlich nicht hergenommen werden.

Die reduktive Aminierung mit den phenolischen Aminen (Tyramin, TME, Tyrosin) erbrachte noch unbefriedigende Ergebnisse. Im RIA verhielten sie sich immunoreaktiv, die IR-Spektren waren nicht auswertbar, die Markierung war bis jetzt noch nicht zufriedenstellend. Die Maximalbindung betrug nur 25 % bei 5 % unspezifischer Bindung. Entweder verschlechtert sich die Immunoreaktivität durch die Jodierung so stark, daß das Antiserum das Derivat nicht mehr bindet, oder die Markierung müßte noch optimiert werden, oder wir haben ein etwas verändertes Derivat hergestellt.

2.7. Antikörpergewinnung

2.7.1. Methodik

Zum Immunisieren wurden 13 Kaninchen unterschiedlicher Rasse (z. B. Neuseeländer, Schecken, Wildkaninchen) ausgesucht, die nicht älter als drei Monate waren. Das Fell am Rücken wurde in Längsstreifen abrasiert.

Das lyophilisierte Antigen (siehe 2.4.2.) wurde mit physiologischer NaCl-Lösung so aufgefüllt, daß für jedes Tier 0,016 μ mol TG/4 in 0,25 ml zur Verfügung standen. Pro mol Untereinheit TG war, je nach Methode (siehe 2.4.2.), 5 - 20 mol Cortisol-Derivat gekoppelt. Zusammen mit der gleichen Menge kompletten Freund'schen Adjuvans (Depotwirkung und Induktor unspezifischer cellulärer Immunreaktionen) wurde es in einer Spritze aufgesogen und bis zur Aufhebung der Phasentrennung durchmischt.

Jedem Kaninchen wurden also insgesamt 0,5 ml der Emulsion an möglichst vielen Stellen des Rückens in Längsbahnen intradermal injiziert. Dadurch wurde eine relativ große Anzahl von Lymphbahnen und dazugehörige Lymphknoten durch geringste Antigenmengen erreicht. Zusätzlich wurde jedem Tier dreimal 0,25 ml Pertussis-Impfstoff injiziert, um so die AK-Produktion noch stärker anzuregen (73).

Die Tiere wurden in der Regel in Abständen von zwei Wochen geboostert. Zwischen den Boosterungen lagen, allerdings zum Teil vor allem anfänglich, zwei- bis dreimonatige Pausen (siehe 2.7.2.1.).

10 bis 14 Tage nach einer Boosterung (schlechtbindende IgM sind wieder abgefallen) erfolgte die Blutentnahme aus lateralen Ohrvenen nach Hyperämisierung mit Xylol. Das Blut, das einige Tropfen Heparin enthielt, wurde abzentrifugiert und das gewonnene Serum (Plasma) bis zur Austestung bei -20°C eingefroren.

Das Serum wurde mit Na-Phosphatpuffer pH = 7,4 so weiterverdünnt, daß Verdünnungsreihen von 1 : 100 bis 1 : 32000 erstellt werden konnten. 100 μl der jeweiligen Antiserumverdünnung wurden mit 100 μl Tracer 75 Minuten inkubiert und dann mit Carrierserum + PEG gefällt (siehe 2.8.2.6.1.). Als Titer wurde die Antiserumverdünnung angegeben, bei der 50 % der eingesetzten Gesamtaktivität, nach Abzug der unspezifischen Bindung, gebunden wurde.

2.7.2. Ergebnisse

2.7.2.1. Titerverlauf

Abb. 13 zeigt den Titerverlauf bei den 13 Kaninchen über 42 Wochen mit einem Antigen, das mit der CDI-Methode hergestellt wurde. Bei der Immunisierung und den ersten vier Boosterungen wurde ein AG verwendet, bei dem 4 mol Cort-3-CMO pro mol TG/4 spezifisch gekoppelt waren. Nach der vierten Boosterung ließen wir wegen des schlechten Ansteigens von den überlebenden Tieren nur drei am Leben. Diese boosterten wir mit drei neuen noch sechsmal mit einem Impfstoff, bei dem 6 mol Hapten pro mol TG/4 gekoppelt waren.

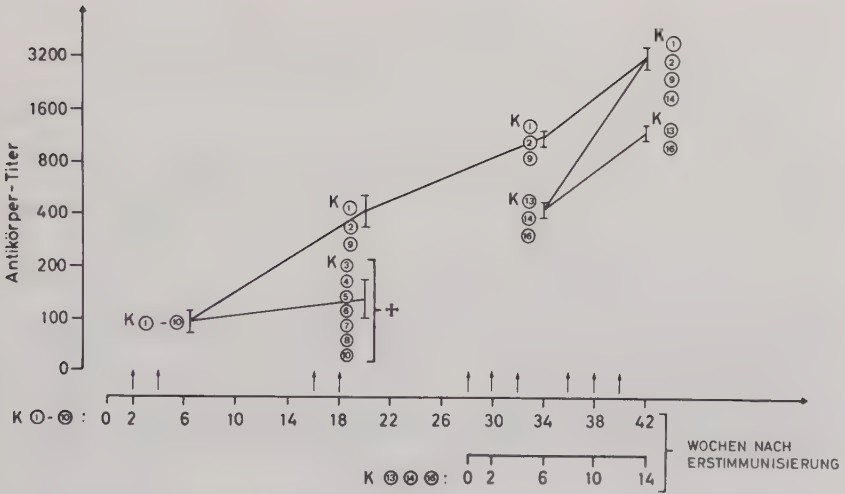


Abb. 13: Titerverlauf Cortisolantiseren
Antigen mit CDI-Methode hergestellt
Die Pfeile kennzeichnen die jeweilige Boosterung

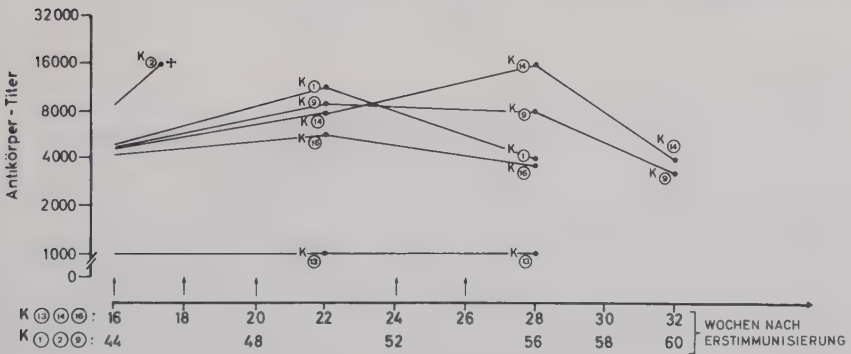


Abb. 14: Titerverlauf Cortisolantiseren
Antigen mit "Gemischter Anhydrid-Methode" hergestellt
Die Pfeile kennzeichnen die jeweilige Boosterung

Abb. 14 zeigt den Titerverlauf, bei dem das AG mit gemischter Anhydrid-Methode hergestellt wurde. Dabei wurde das Vierfache an Cortisol gegenüber der CDI-Methode gekoppelt.

Ein Tier (K 12) erreichte bereits nach der ersten Boosterung mit diesem Derivat einen Titer von 1 : 16000.

2.7.2.2. pH-Abhängigkeit

Bei K 14, Titer 1 : 16000, und K 9, Titer 1 : 9000, untersuchten wir die für unseren Assay (siehe 2.8.2.6.) wichtige pH-Abhängigkeit.

Beide hatten ein sehr gutes Bindungsverhalten bei pH = 4, K 9 sogar ein Optimum (siehe Abb. 15).

Eichkurven konnten von den Kaninchenserum K 1, K 2, K 9, K 14 und K 16 erstellt werden. Alle hatten bei entsprechender Verdünnung einen 50 % Intercept (siehe 2.8.2.9.) zwischen 5 und 15 µg% und waren somit für den routinemäßigen Gebrauch in dieser Hinsicht geeignet.

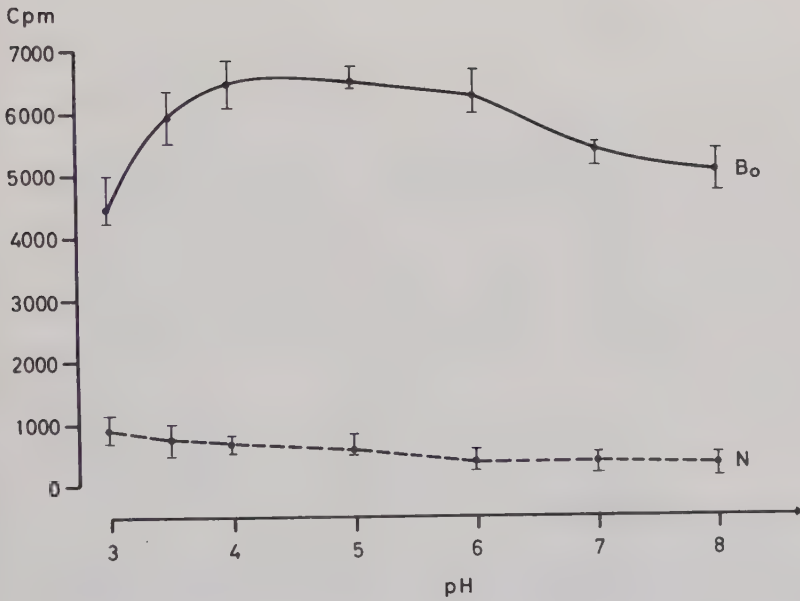


Abb. 15: pH-Abhängigkeit von Antiserum K 9
AK₁-Verdünnung 1 : 8000

2.8. Radioimmunoassay

2.8.1. Prinzip

Der RIA basiert auf der Kompetition radioaktiv markierter und unmarkierter Antigene um ihren spezifischen Antikörper. Als Ergebnis dieser Kompetition nimmt bei entsprechender Antikörperverdünnung die Radioaktivität des Antigen-Antikörperkomplexes in gleicher Weise ab, wie die Konzentration der unmarkierten Antigene im Versuchsansatz zunimmt. Um die Menge an radioaktiv markiertem Antikörper-gebundenem Hormon messen zu können, ist die Abtrennung des Antikörper-gebundenen (bound = B) vom freien (free = F) Hormon notwendig.

2.8.2. Methodik und Vorversuche

2.8.2.1. Material

2.8.2.1.1. Reagenzien

Androstendion

Bethamethason Byk-Essex, München

Carbenoxolon Homburg, Frankfurt

Corticosteron

Cortisol

11-Desoxycorticosteron

11-Desoxycortisol

Dexamethason Ferring, Kiel

Donkey-Anti-Rabbit-Serum Wellcome, Darmstadt

Fludrocortison Heyden, München

Fluocortolon	
γ -Globulin (rabbit)	Serva, Heidelberg
humanes Serumalbumin	Sigma, Taufkirchen
humanes β - und γ -Globulin "	, Taufkirchen
11 α -Hydroxyprogesteron	
¹²⁵ J-Cortisol	Diagnostics Products Corp., USA
Methylprednisolon	Hoechst, Frankfurt
Nucleopore-Filter	Nucleopore Corporation, USA
Östradiol	
Östriol	
Östron	
Polyäthylenglycol 6000	
Prednison	
Prednisolon	
Pregnenolon	
Progesteron	
Spironolacton	Boehringer, Mannheim

Alle in dieser Liste genannten Präparate ohne Firmen-
angabe stammten von der Firma Merck, Darmstadt.

2.8.2.1.2. Geräte

Filtriereinheit RIA-E 6000	Ismatec, Schweiz
Filtriergerät	Hölzel, Dorfen
3-fach Gammazähler BF 6000	Berthold, Wildbad
16-fach Gammazähler NE 1600	Nuclear Enterprises, München
Hamilton-Diluter	Hamilton, Schweiz
Kühlzentrifuge Hettich Roto Silenta/K	Hettich, Tuttlingen
Pipettiereinheit RIA-E 6000	Ismatec, Schweiz
Verdünnungssystem	Ismatec, Schweiz

2.8.2.1.3. Pufferlösungen

0,1M Na-Citrat Puffer pH = 4,0

Lösung A: Dinatriumcitrat 0,1 M

(21,01 g Citronensäure monohydrat + 200 ml NaOH, 1n)

Lösung B: HCl 0,1n (9,86 g 37 % HCl ad 1 Liter mit Aqua bidest.)

55,1 Teile A + 44,9 Teile B (pH nachführen!)

1/15 M Na-Phosphat Puffer pH = 8

Lösung A: Monokaliumphosphat 1/15 M

(9,073 g in 1 l Aqua bidest.)

Lösung B: Dinatriumphosphat 1/15 M

(11,87 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ in 1 l Aqua bidest.)

37 Teile A + 96,3 Teile B (pH nachführen!)

1/15 M Na-Borat Puffer pH = 8

Lösung A: Halbneutralisierte Borsäure 1/15 M
(3,7 g Borsäure + 100 ml 1 n NaOH)

Lösung B: HCl 0,1 n

55,4 Teile A + 44,6 Teile B (pH nachführen!)

2.8.2.1.4. Cortisolstandardlösungen

50 mg Cortisol wurde in 50 ml Äthanol gelöst und mit Aqua bidest. auf 100 ml aufgefüllt. 1 ml dieser Lösung wurde mit 49 ml Aqua bidest. verdünnt. Wir erhielten so unsere 1000 µg% (27,6 µmolar) Stammlösung).

1 ml der Stammlösung verdünnten wir mit 9 ml "Cortisol-freiem" Serum (siehe 2.8.2.4.) und erhielten so einen 100 µg% Standard (2,76 µmolar).

Ausgehend von dieser Konzentration stellten wir durch Überpipettieren im "Cortisol-freien" Serum eine Verdünnungsreihe für die Standardkurve her, mit den Konzentrationen:

100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	µg%
2758	1379	690	345	172	86,2	43,1	21,5	n·mol liter ⁻¹

Die einzelnen Standards wurden in Portionen zu je 50 µl bei -20°C bis zum Gebrauch gefroren.

2.8.2.1.5. Gewinnung und Aufbewahrung der Seren

Die Blutentnahme erfolgte für den Nüchternwert wegen der circadianen Periodik der Cortisolsekretion (50,60) um 9 Uhr vormittags, sonst entsprechend den zeitlichen Vorschriften der in der Klinik durchgeführten Suppressions- und Stimulationsteste. Nach der Venenpunktion wurde das Blut ohne Aspiration in Plastikgefäßen aufgefangen und anschließend bei ca. 3000 U/min. zentrifugiert. Das Serum wurde dekantiert und in der Tiefkühltruhe bei -20°C aufbewahrt. Es wurde darauf geachtet, daß das zu untersuchende Serum nicht mehrmals aufgetaut und eingefroren wurde.

2.8.2.1.6. Verwendete Antiseren und Tracer

Zum Aufbau der Methode standen uns zunächst zwei Cortisol-Antiseren vom Kaninchen zur Verfügung. Eines wurde uns von Herrn Dr. Thoma und Herrn Professor Kuss, I. Frauenklinik der Universität München, überlassen *. Das Antigen wurde nach der Vorschrift von FAHMY (25) hergestellt. Dabei wurde das Cortisol mit O-Carboxymethoxylamin-Hemihydrochlorid umgesetzt und an Albumin gekoppelt (Antiserum Kuss). Das zweite Antiserum erhielten wir von Herrn Privatdozent Dr. Bidlingmaier, Kinderklinik der Universität München*. Es wurde in ähnlicher Weise nach der Vorschrift von ERLANGER (24) gewonnen.

Aufgrund des höheren Titors und der besseren Eigenschaften im sauren pH-Bereich (siehe 2.8.2.5.) gaben wir zu-

* Wir danken den genannten Herren für die freundliche Überlassung der Antiseren

nächst dem Antiserum Kuss den Vorzug. Später zeigten die von uns selbst hergestellten Antiseren (siehe 2.7.) einen noch höheren Titer, eine bessere Spezifität und ein noch besseres Bindungsverhalten im sauren pH-Bereich (z. B. K 9 und K 14).

Die Antiseren verdünnten wir 1 : 50 mit physiologischer Kochsalzlösung und froren diese Stammlösung in 100 µl-Portionen bis zur Verwendung bei -20°C ein.

Nach längerem Suchen und Ausprobieren fanden wir einen für unseren Assay geeigneten kommerziellen Tracer. Es handelte sich um ein mit ^{125}J markiertes Cortisol-3-CMO-TME der Firma Diagnostics Products Corporation. Der Tracer war zur Verhütung von Wandadsorption mit Eiweiß versetzt und lyophilisiert. Er wurde in Portionen von je 3 µCi geliefert. Diese wurden mit etwa 100 ml 0,1 M Na-Citrat Puffer pH = 4 verdünnt. Dies entspricht ungefähr 10 000 cpm pro 150 µl. Später stellten wir den Tracer nach einer eigenen Vorschrift (75) selber her (siehe 2.5.1.).

2.8.2.2. Vorversuche mit dem Antiserum Kuss

Für den Cortisol-RIA wählten wir nach entsprechenden Vorversuchen eine Antiserumverdünnung von 1 : 6000 (Antiserum Kuss), da diese ein Verhältnis von B/T von 0,35 - 0,45 in Abhängigkeit von Qualität und Alter des verwendeten Tracers ergab.

Um die Bindungsfähigkeit des Antiserums zu zerstören, verdauten wir es mit Pepsin/HCl. Zu diesem Zweck ver-

setzten wir 100 μ l unserer Antiserumstammlösung (1 : 50) mit 550 μ l einer Lösung aus 0,2 g% Pepsin in 0,1 n HCl. Am nächsten Tag gaben wir, um den pH wieder neutral einzustellen, und um das Pepsin zu zerstören, 550 μ l 0,1 n NaOH dazu. Der Antikörper war jetzt 1 : 600 verdünnt. Mit "Cortisol-freiem" Serum verdünnten wir ihn auf 1 : 6000 und setzten ihn in den Assay als unbekannte Serumprobe ein.

Der Cortisolgehalt betrug ca. 0,25 μ g% und lag im Bereich der unteren Nachweisgrenze des Assays. Damit störte dieser "endogene" Cortisolgehalt des Antiserums den Aufbau eines Cortisol-RIA nicht.

Abb. 16 zeigt die Bindung von Cortisol-Tracer an das spezifische Cortisol-Antiserum für einen pH-Bereich von 3 bis 8. Ab pH = 4 ändert sich die Bindung nicht wesentlich im Vergleich zu pH = 8 (siehe 2.8.2.5.). Dies gilt sowohl beim Einsatz einer PEG-Fällung (siehe 2.8.2.6.1.) als auch mit einer Doppelantikörper-Methode (siehe 2.8.2.6.2.) zur Trennung des antikörpergebundenen und freien Hormonanteils.

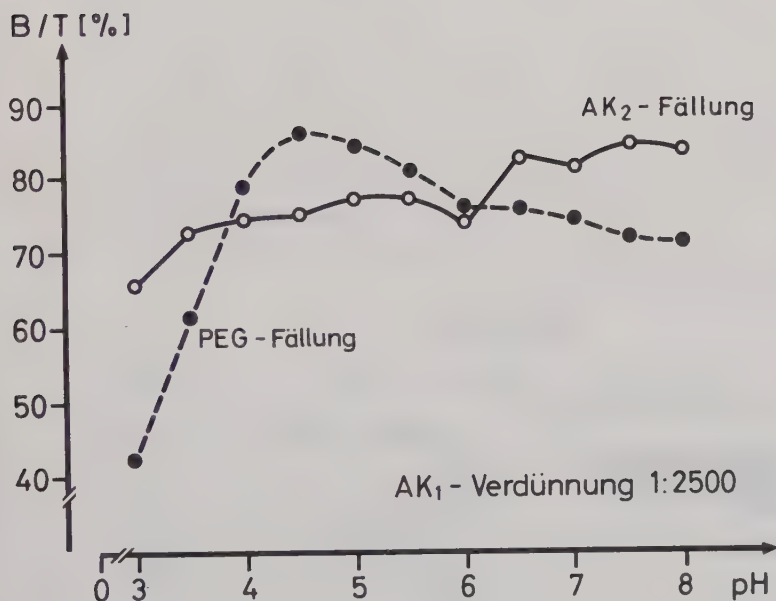


Abb. 16: pH-Abhängigkeit von Antiserum Kuss
AK₂- und PEG-Fällung

Unter Spezifität versteht man die Kreuzreaktion des cortisolspezifischen Antiserums mit anderen Steroiden. Zur Spezifitätsüberprüfung wurden kalte Hormonstandards verschiedener endogener und therapeutisch verwendeter Steroide in den Assay eingesetzt und ihre Verdrängung an der Cortisol-Eichkurve abgelesen. Die Mitreaktionen der einzelnen Steroide wurden in Prozent der Cortisolreaktion angegeben. Aus der Abb.17 ist die zum Teil nicht unerhebliche Mitreaktion der einzelnen Substanzen ersichtlich.

SPEZIFITÄT

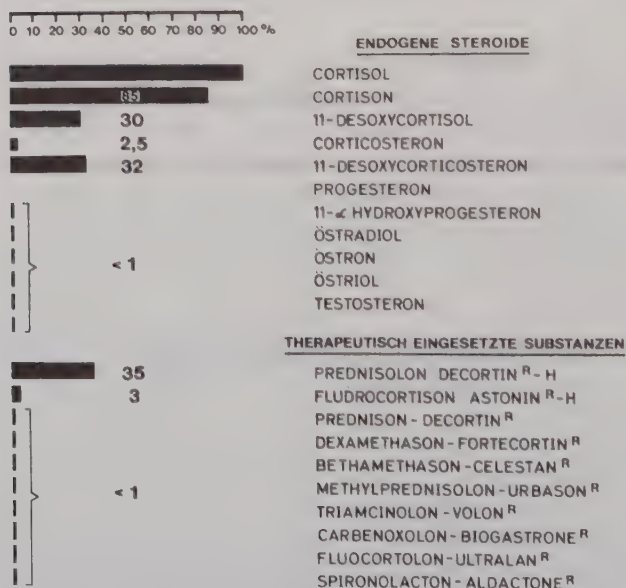


Abb. 17: Spezifität des Antiserum - Kuss

Eingezeichnet ist die Mitreaktion endogener und therapeutisch eingesetzter Steroide in Prozent der Cortisolreaktion (= 100 %)

2.8.2.3. Kinetik der Tracerbindung

Abb. 1 zeigt die Kinetik der Tracerbindung für einen 0 und 15 $\mu\text{g}\%$ Standard über 2 Stunden bei Zimmertemperatur mit dem Antiserum Kuss. Es wird nahezu ein Plateau erreicht. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden Standard und Tracer 75 Minuten inkubiert. Das gleiche Ergebnis erreichte man mit dem Antiserum K 9.

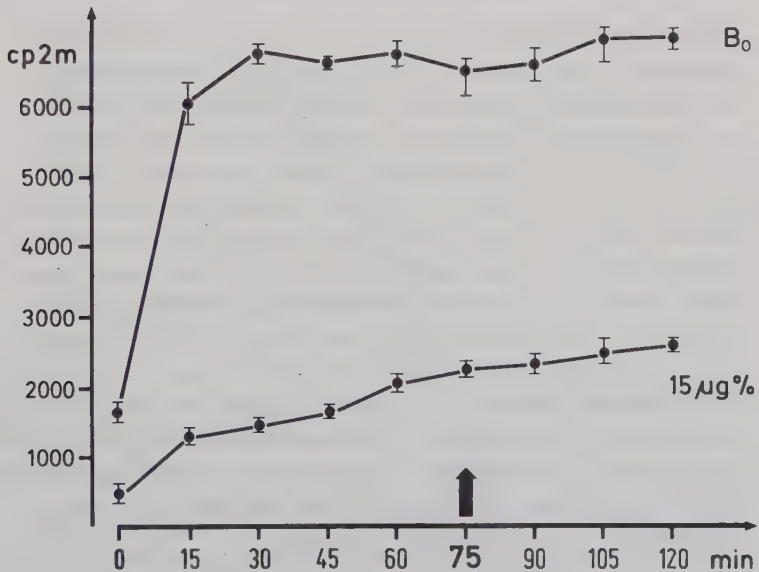


Abb. 18: Kinetik des Antiserum--Kuss bei Zimmertemperatur
für B_0 und 15 $\mu\text{g}\%$ Standard
Der Pfeil kennzeichnet die für den Assay gewählte Inkubationszeit

Der Verlauf der Kinetik ist bei Zimmertemperatur und bei 4°C derselbe. Die Inkubation bei Zimmertemperatur führt allerdings zu einer höheren Bindung. Auch erleichtert das Arbeiten bei Zimmertemperatur die Verwendung des "Modularen Analysensystems" (siehe 2.8.2.8.). Ein entsprechendes Verhalten bezüglich der Temperatur sahen wir auch für die Inkubation mit dem 2. Antikörper bei der Doppelantikörpermethode (siehe 2.8.2.6.2.).

2.8.2.4. "Cortisol-freies" Serum

Zur Standardverdünnung wurde "Cortisol-freies" Serum verwendet. Dazu nahmen wir entweder ein Serum von Normalpersonen nach Dexamethason-Suppression mit an der Puffereichkurve nicht mehr meßbarem Cortisolspiegel, oder ein mit Charcoal extrahiertes Poolserum, wobei es mit diesem Serum bei der Filtration des gebundenen Hormonanteils zu Problemen kam. Als dritte Möglichkeit setzten wir ein sogenanntes "synthetisches Serum" ein. Dazu wurden 4 g humanes Albumin, 1 g β -Globulin und 2 g γ -Globulin in 100 ml Ringerlösung gelöst. Prinzipiell genügte wohl die alleinige Verwendung von Albumin. Wichtig beim Einsatz des "synthetischen Serums" ist die Verwendung steroidfreier Chargen, die man an der Pufferkurve testet. Es muß ein identischer Verlauf der beiden Kurven vorliegen, mit einem nicht meßbaren Cortisolspiegel des "synthetischen Serums".

Zur Herstellung eines Cortisol-freien Serums wurde zuerst eine Charcoal-Extraktion (39) verwendet. Dazu rührten wir 100 ml Pool-Serum mit 10 g Norit A 12 Stunden im

Eisbad und ließen dann das Gemisch über Nacht stehen. Am nächsten Tag rührt man es wieder 30 Minuten und zentrifugiert es anschließend 20 Minuten bei 3000 U/min. Der gesammelte Überstand wird in einem Seitzfilter mit Stickstoffüberdruck gereinigt. Anschließend verglichen wir die Maximalbindung des "stripped" Serums mit der im Puffersystem. Abb. 19 zeigt den identischen Verlauf einer Serumstandardkurve und einer Pufferstandardkurve.

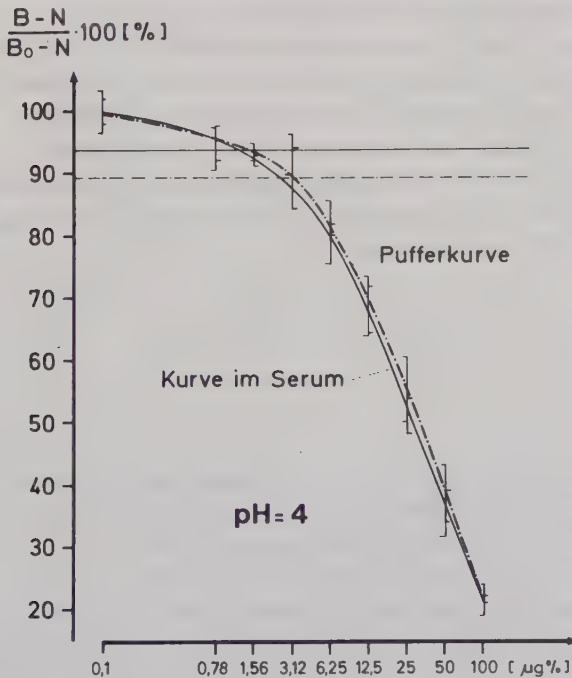


Abb. 19: Cortisolstandardkurven im Serum
und im Puffersystem

Leider zeigte es sich, daß bei Einsatz eines mit Charcoal extrahierten Serums nicht immer eine völlige Übereinstimmung zwischen Serum- und Pufferstandardkurve zu erzielen war, daß also offensichtlich diese Methode recht störanfällig war (74). Abb. 20 zeigt die Abweichung zwischen einer Puffer- und einer Serum-Standardkurve bei Einsatz der Doppelantikörper-Methode. Der Doppelantikörperkomplex ist vom freien Hormonanteil durch Filtration (siehe 2.8.2.6.5.) getrennt. Bei Verwendung einer PEG-Fällungsmethode (siehe 2.8.2.6.1.) ergibt sich eine viel bessere Übereinstimmung zwischen Serum- und Pufferstandardkurve. Die Pufferstandardkurve für die PEG-Fällung ist übersichtshalber nicht eingezeichnet. Sie verläuft zwischen PEG-gefällter Serumstandardkurve und der Pufferstandardkurve, die mit der Doppelantikörpermethode getrennt ist.

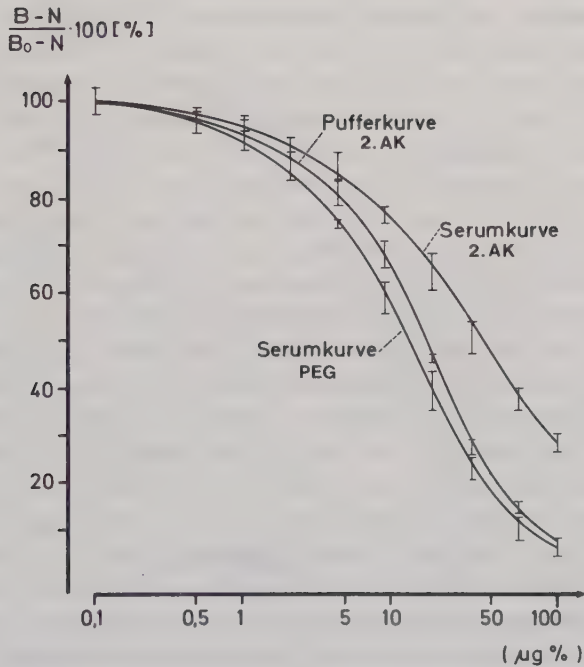


Abb. 20: Cortisolserum- und Pufferstandardkurven
bei PEG- und Doppelantikörperfällung
Die PEG-gefällte Pufferkurve ist übersichts-
halber nicht eingezeichnet; sie verläuft zwi-
schen Serumkurve PEG und Pufferkurve 2. AK.

Die Charcoal-Nullserum-Standardkurve mit Doppelantikörperfällung verlief nicht nur wesentlich flacher als die dazugehörige Pufferkurve, die absoluten Zählraten dieser Eichkurve lagen durchschnittlich über denen der Pufferkurve. Dieser Effekt fehlte bei den zu messenden Serumproben, so daß die Werte falsch hoch wurden. Es muß die manchmal auftretende Diskrepanz zwischen Serum- und Puffer-Standardkurve bei Einsatz der Doppelantikörpermethode im Zusammenhang mit dem durch Charcoal gestripten Nullserum und dem Filtermaterial zu suchen sein. Eine der möglichen Erklärungen wäre, daß durch geringe Charcoalreste der Bound-Anteil auf dem Filter vergrößert wird und dadurch die Eichkurve flacher verläuft. Da wir im Hinblick auf die Automatisierung mit dem modularen Analysensystem (siehe 2.8.2.8.) auf eine Doppelantikörper-Methode angewiesen waren, setzten wir dann ein künstliches Cortisol-freies Serum ein, das aus Albumin- und Globulinlösungen in Höhe der Serumkonzentrationen zusammengestellt war (Cortisolfreie Chargen!) oder ein Serum von Normalpersonen nach Dexamethason-Suppression. Abb. 21 zeigt die Übereinstimmung zwischen Pufferstandardkurve und Standardkurve im künstlichen Cortisol-freien Serum.

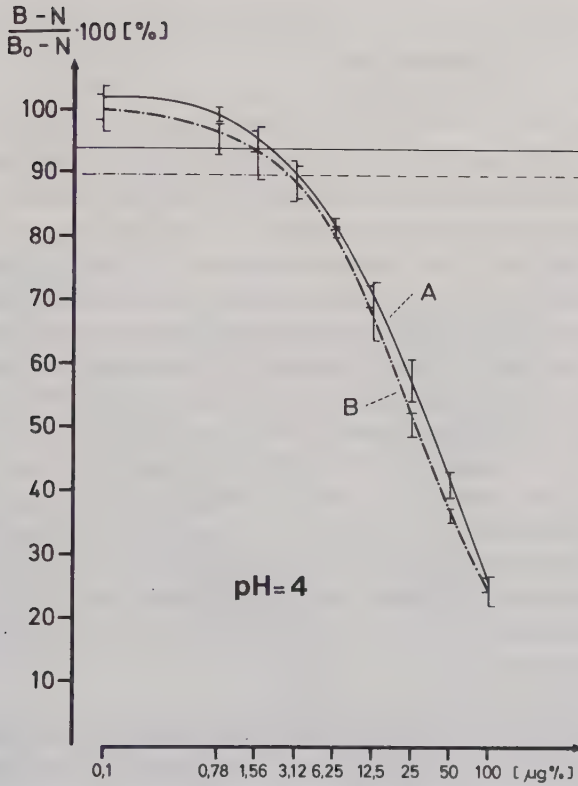


Abb. 21: Pufferstandardkurve (A) und
Standardkurve im künstlichen Serum (B)

2.8.2.5. Denaturierung der Cortisol-bindenden Serumproteine

Das Cortisol ist zu einem hohen Prozentsatz an Serumproteine gebunden. Nur das durch Dissoziation freigesetzte Hormon ist biologisch aktiv. Bei den Cortisol-bindenden Serumproteinen handelt es sich in erster Linie um das CBG (4a), ein Glykoprotein mit 26 % Kohlenhydratanteil und einer Serumkonzentration von etwa $0,7 \mu\text{M}$ (12). Das Albumin mit 800 mal höherer Serumkonzentration bindet das Cortisol in weit geringerer Affinität. So ist die Assoziationskonstante des CBG zum Cortisol bei 4°C um den Faktor 500 größer als die des HSA (82). Die Affinität des CBG zum Cortisol ist von mehreren Faktoren abhängig, wie z. B. pH, Temperatur, Harnstoffgehalt (12). Die Temperaturabhängigkeit macht man sich bei der Hitzedenaturierung zu Nutze. Die Assoziationskonstante ist bei 4°C am größten und sinkt bei steigender Temperatur, bedingt durch eine relativ größere Zunahme der Dissoziationsgeschwindigkeit.

Um den Gesamtcortisolgehalt im Serum radioimmunologisch zu messen ist es also notwendig, das Cortisol von den bindenden Proteinen freizusetzen. Dabei bieten sich mehrere Möglichkeiten an, die sich aber zum Teil nur schwerlich automatisieren lassen.

Bei der Hitzedenaturierung verdünnten wir $100 \mu\text{l}$ Serum mit 2 ml Na-Boratpuffer $\text{pH} = 8$ und erhitzen diese Lösung 30 Minuten lang bei $60 - 65^{\circ}\text{C}$ (42). Abb. 22 zeigt die Parallelität der hitzedenaturierten Serumkurve mit der

Pufferkurve. Ein möglicher Nachteil dieser Methode ist neben dem Arbeitsaufwand die Tatsache, daß nicht nur die Serumproteine denaturiert werden, es kann sich auch das Cortisol zersetzen (51). Beginnt die Zersetzung bei den funktionellen Gruppen des Steroids, geht dies natürlich auf Kosten der Spezifität des Assays.

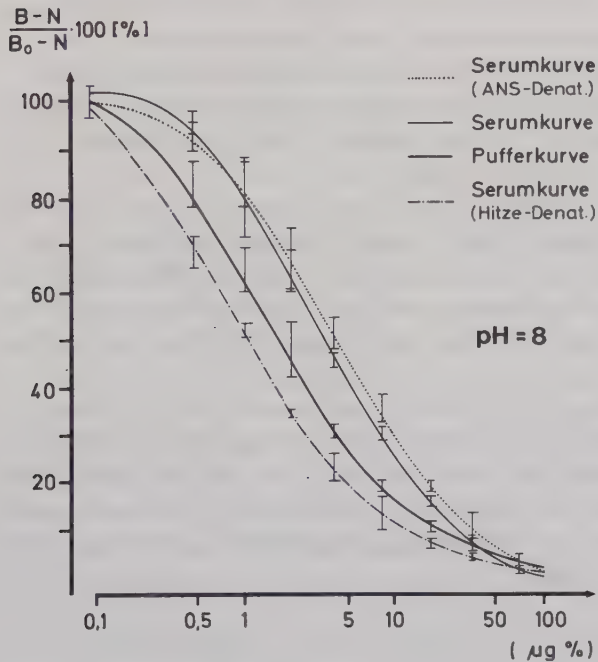


Abb. 22: Vergleich unbehandelte Serumkurve
ANS-behandelte Serumkurve
Hitzedenaturierte Serumkurve
Pufferkurve

(Einzelheiten im Text)

Bei der ANS-Denaturierung (= 8-Anilino-1-Naphthalin-Sulfonsäure) handelt es sich um eine chemische Denaturierung bindender Serumproteine, wie sie in zahlreichen Kits für T_3 und T_4 verwandt wurde (36). Wir versetzten 100 μ l einer Serumverdünnung aus 100 μ l Serum und 2 ml Na-Boratpuffer pH = 8 mit 100 μ l einer 400 mg% ANS-Lösung. Leider zeigte es sich, wie in Abbildung 22 zu sehen ist, daß die mit ANS behandelte Cortisolserum-Eichkurve in logitlog-Darstellung und die unbehandelte Serum-Eichkurve identisch verlaufen. Wesentlich steiler, also empfindlicher, verläuft die hitzedenaturierte Serumeichkurve. Die etwas größere Steilheit dieser Kurve gegenüber der Pufferkurve ohne Serumzusatz ist unter anderem wahrscheinlich durch eine gewisse Adsorption des Cortisols in der Pufferkurve an die Gefäßwand bei pH = 8 bedingt. Die ANS-Methode ist somit für unser Assay-System nicht anwendbar, auch kann ANS mit dem spezifischen Antikörper interferieren (36).

Das pH-Optimum der Bindung zwischen CBG und Cortisol liegt bei pH = 8. Die Affinität sinkt sowohl im alkalischen wie auch im sauren Bereich. Das CBG ist unterhalb eines pH von 5 irreversibel denaturiert. Die Assoziationskonstante ist bei einem pH = 4 so niedrig, daß sie keine Rolle mehr spielt (12).

Wie im Kapitel 2.7.2.2. und 2.8.2.2. gezeigt werden konnte, verfügt das Antiserum Kuss über eine gute Bindung bei pH = 4 unabhängig von der verwendeten Fällung. Einer der selbst hergestellten Antikörper hatte sogar ein pH-

Optimum bei 4 (K 9). Dies erlaubte uns einen Assay ohne Extraktion oder aufwendige Pipettierschritte durchzuführen, ein wichtiger Schritt hin zur Automatisierung.

Es wurde untersucht, inwieweit eine schwankende HSA-Konzentration die Richtigkeit des Assays bei $\text{pH} = 4$ beeinflusst, nachdem HSA ebenfalls eine Bindungskapazität für Cortisol besitzt. Pro Probe wurden 3 μl Serum entsprechend ca. 0,1 mg Albumin im Ansatz eingesetzt, mit dem Tracer zur Verhinderung von Wandadsorption nochmals 0,25 mg Albumin pro Probe.

Mit dem spezifischen Antikörper inkubierten wir deshalb 100 μl Tracer und 100 μl Albuminlösung von 0 - 16 g%. Der Albumineinfluß war völlig unbedeutend. Lediglich bei der Konzentration von 16 g% ergab sich eine um etwa 5 % schlechtere Bindung an den Antikörper im Vergleich zu den übrigen Albuminlösungen. Erwähnenswert ist noch, daß wir ja 100 μl der Albuminlösung und nicht wie im Assay 3 μl zur besseren Demonstration verwendet haben, so daß also auch bis zu 80-fach höhere Albuminkonzentrationen ohne Einfluß sind. Die genauere Ermittlung der sicherlich sehr niedrigen Assoziationskonstanten für Albumin und Cortisol bei $\text{pH} = 4$ gelang nicht.

2.8.2.6. Trennung von gebundenem
und freiem Antigen

2.8.2.6.1. Fällung mit einer Polyäthylenglycol-Lösung

Bei dieser Methode macht man sich zu Nutze, daß eine PEG-Lösung Gamma-Globuline präzipitiert (38, 61). DESBUQUOIS und AURBACH (17) optimierten dieses Prinzip für Peptidhormone; es lassen sich damit aber auch Steroid-Hormone (1, 49) fällen. Dem Reaktionsgemisch gibt man 1 ml einer auf 4°C gekühlten Lösung von 12,5 g% PEG in einem 0,02 M Na-Phosphatpuffer pH = 7,4 bei, sowie als Carrier, um den Niederschlag zu vergrößern, 0,8 bis 1,0 mg/ml Gamma-Globulin oder 30 bis 40 µl/ml Serum. Man zentrifugiert 10 Minuten bei 4°C und 3000 g. Gezählt wird Bound im Niederschlag. Diese relativ schnelle und einfache Methode ist natürlich relativ unspezifisch, auch ist die unspezifische Bindung höher als bei der Doppelantikörper-Technik. Bei Seren von Patienten mit Dysproteinaemien, wie sie z. B. viele Dialyse-Patienten haben können, kann es zu falschen Ergebnissen kommen (87).

2.8.2.6.2. Doppelantikörper-Methode

Hierbei wird nach der Reaktion zwischen Antigen und spezifischem Antikörper dem Reaktionsgemisch eine ausgetestete Menge einer 2. Antiserumverdünnung zugefügt, die in der Lage ist, den spezifischen Antikörper und das daran gebundene Antigen aus der Lösung auszufällen. Die-

ser sogenannte 2. Antikörper ist ein Antikörper, der generell gegen Gamma-Globuline einer bestimmten Tierart spezialisiert ist. Stammt der spezifische Antikörper z. B. vom Kaninchen, so muß der 2. Antikörper (= präzipitierender Antikörper) gegen Gamma-Globulin vom Kaninchen gerichtet sein. Dementsprechend wird er hergestellt durch Verimpfen von Kaninchen-Gamma-Globulin an Schafe, Esel oder Ziegen. Nach einer gewissen Inkubationszeit des Reaktionsgemisches mit dem 2. Antikörper, die konzentrations- und chargenabhängig ist, wird der Niederschlag, der gebundenes Antigen oder Bound enthält, entweder durch Zentrifugieren oder durch Filtern über Zellulose-Acetat- oder Polycarbonat-Filter (Nucleopore) aus dem Reaktionsgemisch getrennt. Bei dieser klassischen Methode der Doppelantikörpertrennung ist es stets erforderlich, dem Reaktionsgemisch eine geringe Menge Kaninchen-Gamma-Globulin zur Bildung eines Kopräzipitats zuzusetzen (22).

Ein Nachteil dieser Methode besteht in der nötigen Inkubationszeit. Der Vorteil liegt in der hohen Spezifität und in der möglichen Automatisierung, die sich anbietet, weil zu keinem Zeitpunkt ein Schütteln der Reaktionsansätze erforderlich ist, so daß in offenen Reaktionsgefäßen gearbeitet werden kann.

Als 2. Antiserum wurde ein Anti-Kaninchen-Gamma-Globulin-Serum vom Esel verwendet. Es wurde bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt und für die Doppelantikörperfällung mit 0,1 M Na-Citrat Puffer pH = 4 (siehe 2.8.2.1.) und für die optimierte Doppelantikörperfällung (siehe 2.8.2.1.) mit 6 g% PEG in 0,1 M Phosphatpuffer pH = 7,4 (siehe 2.8.2.1.) auf

die jeweilige Gebrauchsverdünnung gebracht. Für jede Charge dieses Antiserums mußte die optimale Verdünnung neu ausgetestet werden. Hierzu wurden B_0 -Werte erstellt, wobei 100 μ l des 2. Antikörpers in verschiedenen Verdünnungen (1 : 2 bis 1 : 64) dem Reaktionsgemisch zugegeben wurde. In der Regel erreichten wir mit der Verdünnung von 1 : 24 die höchste Bindung, mit einem Plateau zwischen 1 : 20 und 1 : 28. Während einer 20 Stunden Inkubationskinetik erreichte das 2. Antiserum bei Zimmertemperatur und pH = 4 ein Plateau bereits nach 2 Stunden.

Bei der Doppelantikörperfällung wurde dem Reaktionsgemisch zur Bildung eines Kopräzipitates γ -Globulin vom Kaninchen in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Wir verwendeten beim Cortisol-RIA nach Austestung 7 μ g/Probe. Dazu lösten wir 250 mg γ -Globulin in 35,7 ml Natriumphosphatpuffer pH = 7,4. Jeweils 500 μ l-Portionen reichten für 50 Proben als Zusatz zur 2. Antiserumlösung.

2.8.2.6.3. Verschiedene Inkubationsbedingungen

Es wurde der Versuch unternommen, aus Rationalisierungsgründen spezifischen 1. Antikörper und den 2. Antikörper in den ausgetesteten Verdünnungen gleichzeitig zu inkubieren. Der erste Versuch fand bei pH = 8 mit Hitzedenaturierung (siehe 2.8.2.5.) statt. Nach 3 Stunden war die Reaktion im Gleichgewicht. Die Eichkurve ergab eine zufriedenstellende Empfindlichkeit. Bei pH = 4 allerdings war die Bindung insgesamt so schlecht, daß wir diese Me-

thode nicht weiter verfolgt. Hitzedenaturierung und gleichzeitige Inkubation über 3 Stunden erbrachte für uns wegen der Möglichkeiten der optimierten Doppelantikörperfällung (siehe 2.8.2.6.4.) keine Vorteile.

Einen Tag lang inkubierten wir bei 4°C 100 µl spezifisches Antiserum 1 : 50, verdünnt mit 250 µl 2. Antiserum, aufgenommen in 1 ml Na-Phosphatpuffer pH = 7,5. Nach dieser Vorinkubation verdünnten wir diese Lösung mit 20 ml Na-Citratpuffer pH = 4 und verwendeten dies für etwa 100 Proben. Die Bindung im Assay war schlechter als bei den herkömmlichen Methoden und die Empfindlichkeit der Eichkurve bei der verwendeten Verdünnung für Routinebestimmungen unbefriedigend.

2.8.2.6.4. Optimierung der Doppelantikörper-Technik

Wir haben beim hCT-RIA (siehe 3.2.5.2.) eine Methode entwickelt, die die Trennung von freiem und gebundenem Antigen in Radioimmunoassay-Systemen beschleunigt, ohne daß ein Verlust an Bindung der Spezifität entsteht (89). Die Inkubationszeit des 2. Antikörpers kann dabei bis auf Sekunden reduziert werden. Bei dieser Technik wird eine Mischung von zweitem Antikörper und PEG eingesetzt und sie funktioniert in Systemen, in denen ein spezifischer erster Antikörper von Kaninchen, Ziegen oder Schafen verwendet wird.

Der Cortisol-Assay findet im Gegensatz zum hCT-RIA bei pH = 4 statt und mit 3 μ l Serum pro Probe wird bedeutend weniger Protein verwendet als bei den RIA für PTH, hCT, ACTH. Dies mag eine Erklärung sein, warum die Kinetik der kombinierten Technik hier eine Ausnahme macht. Sie führt nicht nach Sekunden, sondern erst nach einer Stunde zu einem Plateau. Abb. 23 zeigt die Kinetiken für die Doppelantikörper-Technik und für die kombinierte Technik bei pH = 4 und nach Umpufferung mit Na-Phosphatpuffer auf pH = 7,4. Die Kinetik der klassischen Doppelantikörper-Technik erreicht nach 2 Stunden Inkubationszeit ein Plateau, die der kombinierten Technik bereits nach einer Stunde, wobei die Umpufferung auf pH = 7,4 zu höherer maximaler Bindung und geringerer unspezifischer Bindung führt. Das Pipettierschema zu dieser Methode ist im Kapitel 2.8.2.7. beschrieben.

2.8.2.6.5. Zentrifugation und Filtration

Beim Cortisol-RIA verwandten wir die optimierte Doppelantikörperfällung. Bei Probenzahlen pro Durchgang bis etwa 200 trennten wir die Doppelantikörperkomplex vom freien Hormonanteil durch Zentrifugation bei 3000 g, 4°C 15 Minuten lang. Nach Aspiration des Überstandes mit einer Wasserstrahlpumpe erfolgte das Zählen des Niederschlags 2 Minuten in einem 16-Kanal-Zähler. Bei größeren Probenzahlen (300 - 650) trennten wir den Komplex durch Filtration unter Einsatz des "Modularen Analysensystems" (48) (siehe 2.8.2.8.). Wir versuchten auch die Filtration des an den spezifischen Antikörper gebundenen Hor-

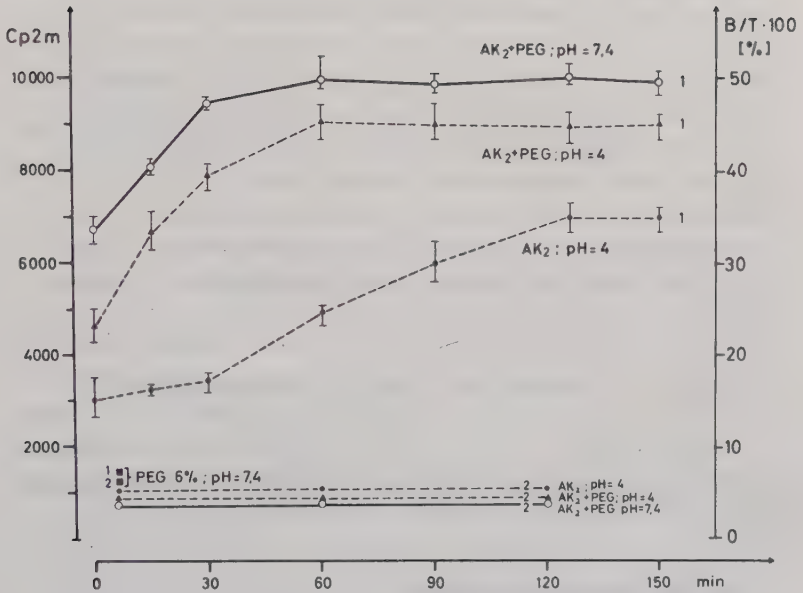


Abb. 23: Kinetik der Trennung von gebundenem und freiem Antigen bei Zimmertemperatur
 PEG-Fällung (60 g/l) ($\blacksquare$) und AK_2 -Fällung bei pH = 4 ($\bullet$ --- $\bullet$) alleine und in Kombination bei pH = 4 ($\blacktriangle$ --- $\blacktriangle$) und bei pH = 7,4 ($\circ$ --- $\circ$)
 1 = B_0 2 = N

monanteils allein, ohne Zusatz eines 2. Antikörpers. Diese Methode ließ sich beim Cortisol nicht durchführen, da die Aktivität durch den Filter lief.

Nötig ist es, daß der Komplex spezifischer Antikörper und gebundenes markiertes und unmarkiertes Antigen so groß ist, daß er bei der Filtration über Zellulose-Acetat- oder Polycarbonat-Filter (Porengröße: 0,2 µm) hängen bleibt und das ungebundene Antigen durch die Poren gespült werden kann. Von entscheidender Bedeutung ist dabei die einwandfreie Beschaffenheit jedes Filters.

2.8.2.7. Endgültiger Cortisol-Radioimmunoassay

In der Tabelle 1 sind noch einmal sämtliche Assaydetails, wie Pipettierschema, Inkubation und Trennung zusammengefaßt.

Tabelle 1 Assaydetails

Standards bzw. Seren	3 µl
¹²⁵ J Cortisoltracer	
in Na-Citratpuffer 0,1 M pH = 4 (mit 0,25 g% Gelatine und 0,25 g% BSA)	
gelöst, ca. 10.000 cpm/150 µl	150 µl
Cortisolantikörper	
1 : 6000 mit Na-Citratpuffer 0,1 M pH = 4 verdünnt	100 µl
75 Minuten Inkubation bei Zimmertemperatur	

400 μ l 2. Antikörper (chargenabhängig!)
in 50 ml 6 g% PEG in Na-Phosphatpuffer
1/15 M pH = 7,4 (reicht für je 100 Proben)
mit Kaninchen γ -Globulin 7 μ g/Probe 500 μ l

60 Minuten Inkubation bei Zimmertemperatur

Trennung durch Filtration oder Zentrifugation
2 Minuten Zählzeit

2.8.2.8. Automatisierung

Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Cortisol-RIA zu automatisieren.

Folgende Vorarbeiten ermöglichten dies:

1. Verwendung eines ^{125}J -Tracers (siehe 2.5. und 2.8.2.1.6.)
Zusatz und Schütteln von Szintillationsgemisch wie beim ^3H -Tracer fällt weg.
2. Assay bei pH = 4 (siehe 2.8.2.5.) - der arbeitsaufwendige und schwer zu automatisierende extraktive Schritt entfällt.
3. Arbeiten bei Zimmertemperatur (siehe 2.8.2.3.) - dies ist kein notwendiges Ergebnis, aber es erleichtert die Arbeit.
4. Optimierte Doppelantikörpermethode (siehe 2.8.2.6.4.)
- sie erlaubt die Verwendung der Filtrationstechnik.

Zur Automatisierung wurde ein Analysensystem mit vier unabhängig von einander arbeitenden Modulen verwendet (48).

Als Probenträger wurden Mikrolitergefäße (2 ml Polyäthylenröhrchen) in Reaktionsketten bis zu 650 Gliedern eingesetzt, in die Standardlösungen und Patientenserum pipettiert wurden.

Beim Verdünnungssystem läuft zu der mit den Seren pipettierten Reaktionskette eine leere Reaktionskette parallel (Doppelkettenprinzip). Eine Verdrängungskolbendosiervorrichtung entnimmt jeder Probe der 1. Kette 3 µl Serum und pipettiert dies zusammen mit 150 µl Tracer aus einem Behälter in die 2. Kette. Bei Verwendung von kleineren Probenzahlen setzten wir statt dessen einen Hamilton-Diluter ein.

Mit der Pipettiereinheit werden unter Verwendung einer elektronisch gesteuerten Hamilton-Repetierspritze im scharfen Strahl, so daß sich Schüttelvorgänge erübrigen, 1. und 2. Antikörper-Lösung zugefügt.

In der Filtrationseinheit wird zur Bound/Free-Trennung diskontinuierlich über Nucleopore- oder Zelluloseacetat-Membranen (Porenöffnung 0,2 µm) filtriert. Jeweils 6 Proben gleichzeitig werden mit einer Pumpe auf die Filter transportiert. Eine Vakuumpumpe saugt den Free-Anteil ab, Bound bleibt auf dem Filter. Die Reaktionsgefäße werden zweimal mit einer 0,8 g% PEG-Lösung gespült. Dies hat mehrere Vorteile: Die gesamte Reaktionslösung gelangt über das Filtermaterial, die Schläuche werden für die nächsten Proben gereinigt, der Free-Anteil wird besser durchgespült und die Filter werden gleichmäßiger benetzt und brechen dadurch nicht.

Für die verschiedenen Assays müssen in Abhängigkeit von der Serummenge Pumpgeschwindigkeit und -dauer ermittelt werden.

Die Membranen werden von einem Vorspannfilm getragen, der, nachdem die radioaktiven Filterpositionen beidseitig zur Vermeidung von Kontamination mit Klebefolie abgedeckt sind, automatisch aufgerollt wird.

Die Film-Auffangspule kann direkt in einen eigens dafür konstruierten Gamma-Zähler eingelegt werden. Drei Szintillationsdetektorenpaare liegen nebeneinander mit jeweils 3 mm Innenweite. So können drei Proben gleichzeitig gezählt werden mit einer um etwa 10 % höheren Ausbeute als bei anderen Systemen. Der Wechsel von jeweils drei gezählten Proben zu den nächsten drei dauert 5 Sekunden. Eine Filmrolle mit 800 Proben hat einen Durchmesser von 14 cm und nimmt somit bei der Abfallbeseitigung nicht viel Platz in Anspruch.

Die einzelnen Module verfügen über folgende Kapazität pro Stunde:

Verdünnungssystem:	170 bis 250 Proben
Pipettiereinheit:	1700 Proben
Filtrationseinheit:	150 bis 360 Proben, in Abhängigkeit von Volumen und Filtrationsgeschwindigkeit.

Die Präzision der einzelnen Module, beschrieben durch Variationskoeffizient von verdünntem, hinzugefügtem und filtriertem Tracer (^{125}J -Insulin) betrug für die Pipettiereinheit (48) 0,88 %, für das Verdünnungssystem 0,53 % und für das Filtriergerät 0,1 %.

2.8.2.9. Auswertung, Eichkurve (Kalibrierkurve)
und Empfindlichkeit

Der vom Zählen (siehe 2.8.2.8.) erhaltene Lochstreifen wird mittels einer EDV-Anlage (Siemens 404/3) mittels Spline-Function ausgewertet. Dabei wird durch ein mathematisches Verfahren ein möglichst stetiger und glatter Kurvenzug aus den experimentellen Daten ermittelt (46, 47). Die Standardkonzentrationen werden dabei logarithmisch auf der Abszisse aufgetragen, so daß die Auswertung über eine sigmoide Kurve nach Spline-Approximation vorgenommen werden kann. Hierdurch ist gegenüber einer hyperbelförmigen Kurve in logit-log-Transformation mit zwanghafter Linearisierung der Eichkurve die Interpolationsgenauigkeit erhöht.

Bei der Auswertung werden noch ausgedruckt die für die Charakterisierung der Eichkurve wichtige untere Nachweisgrenze und der 50 % Intercept, sowie die von der Eichkurve abgelesenen unbekannten Serumwerte mit dem Vertrauensbereich der Mehrfachwerte. Die untere Nachweisgrenze eines Assays gibt die geringste Hormonkonzentration an, die an der Eichkurve noch abgelesen werden kann. Sie berechnet sich aus der Streuung der Mehrfachwerte des Nullstandards durch Abzug der dreifachen relativen Standardabweichung von B_0 (= 100 %) und Ablesen des Schnittpunktes dieses Prozentwertes auf der Eichkurve.

Der 50 % Intercept gibt die Hormonkonzentration an, bei der noch 50 % der Aktivität des Nullstandards gebunden

werden. Dieser Zahlenwert ist ein Maß für die Steilheit bzw. Empfindlichkeit der Eichkurve.

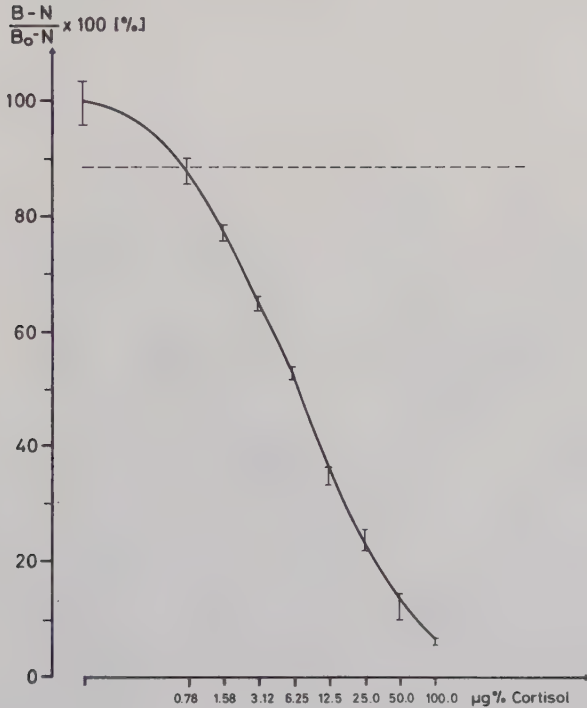


Abb. 24: Cortisol-Eichkurve

Untere Nachweisgrenze: 0,78 $\mu\text{g}\%$

50 %-Intercept: 6,25 $\mu\text{g}\%$

Abb. 24 zeigt die Eichkurve des Cortisol-RIA in einem Bereich von 0 - 100 $\mu\text{g}\%$ (0 - 2758 nmol · Liter⁻¹). Dies erlaubt, alle anfallenden Patientenserum (auch nach Stimu-

lationstesten) mit derselben Verdünnung zu bestimmen. Die untere Nachweisgrenze liegt unterhalb der geringsten Standardkonzentration. Der 50 % Intercept liegt bei 12,5 µg% und damit etwa beim Mittelwert des Normal-kollektivs.

2.8.3. Rechenprogramme

Ein wichtiger Schritt zur Optimierung von Meßmethoden und zur Laborautomatisierung und -rationalisierung ist der Einsatz einer elektronischen Datenverarbeitungsanlage. Mit hoher Geschwindigkeit und großer Zuverlässigkeit können eine Unmenge von Daten bearbeitet werden. Ebenso wichtig ist eine umfangreiche Rechnerbibliothek, von der gezielt spezifische Programme abgerufen werden können. Darunter versteht man nach DIN 44 300 (52) eine in einer beliebigen Sprache (z. B. Fortran IV, Cobol, Algol, Assembler...) abgefaßte, vollständige Anweisung zur Lösung einer Problemstellung mittels einer Rechenanlage.

Der der Medizinischen Klinik Innenstadt zur Verfügung stehende Computer ist von der Firma Siemens, Modell 404/3 (71). Es handelt sich dabei um eine kleine universelle Datenverarbeitungsanlage mit hoher interner Verarbeitungsgeschwindigkeit und einem leistungsfähigen Befehlsvorrat. Die Anwendungsmöglichkeiten umfassen folgende Funktionen: Rechnen, Meßwerterfassung, Steuern, Überwachen und Sammeln, Umsetzen, Aufarbeiten und Konzentrieren der Daten.

Die Hardware (= Menge der technischen Einzelteile einer RA) besteht aus einer Zentraleinheit mit acht Unterkanälen zum Anschluß der Peripheriesteuerung für Bedienungsichtgerät, Wechsellattenspeicher, Lochkarten- und Lochstreifenleser und -stanzer sowie eines Schnelldruckers, des Magnetbandelements und der Datenübertragungssteuerung.

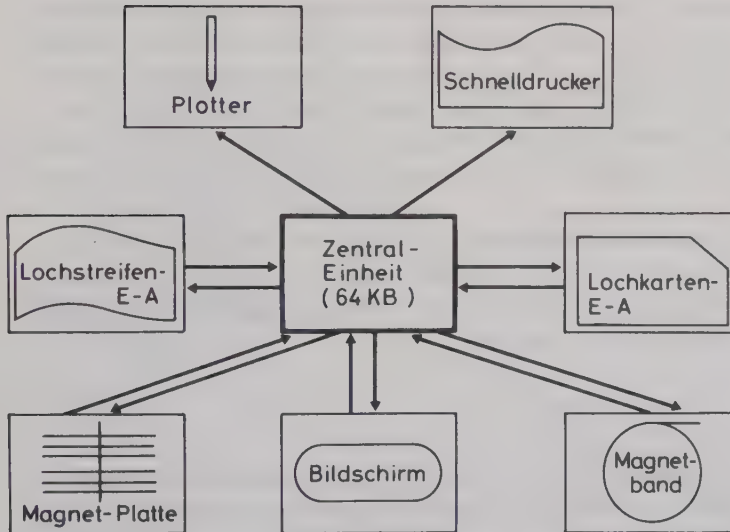


Abb. 25: Konfiguration der EDV-Anlage

Unter der Software (6, 71) versteht man die Menge von Programmen, die zum Betrieb der RA benötigt werden. Bei der Siemens 404/3 besteht die Software aus einem Grund- und Plattebetriebssystem. Dazu gehören Arbeitsprogramme wie Übersetzer- und Dienstprogramme und zur Koordination Steuerprogramme wie Job- und Data-Management. Das PBS verfügt über drei Sprachübersetzer, nämlich für Assembler, ANS-Cobol und Fortran IV, die das Quellprogramm in das Objektprogramm, die Maschinensprache, übersetzt.

Fortran IV (6), in dem die folgenden Programme geschrieben sind, ist eine sogenannte problemorientierte Sprache; das heißt es ist, wie auch Algol, besonders geeignet für die numerische Behandlung naturwissenschaftlicher und technischer Aufgaben. Fortran IV ist, sieht man von der Ein- und Ausgabe ab, von der benutzten Anlage unabhängig.

Die folgenden Programme sind alle kommentiert, erkenntlich am "C" in den aufgelisteten Primärprogrammen, so daß sich eine ausführliche Diskussion der einzelnen Programmierschritte erübrigt.

2.8.3.1. Tabel

Das Programm "Tabel" dient zur Tabellierung von Papier, um dann leichter z. B. einer bestimmten Serumprobe diverse Daten zuzuordnen. Am Bildschirm eingegeben werden: Die Zahl der Kästchen pro Zeile, die Höhe der Kästchen in Zeilen und die Anzahl der gewünschten Seiten. Limitiert werden die Kombinationen durch die Zeilenbreite und die Spaltenlänge. Ausgedruckt werden dann die Seiten mit gleichgroßen Kästchen (Abb. 26).

```
PROGRAM TABEL
C   TABELLIEREN VON PAPIER NACH EINGABE VON: KAESTCHENANZAHL QUER,
C   KAESTCHENHOEHE IN ZEILEN UND SEITENANZAHL
INTEGER*2 QSTR(119),SSTR(119),STR,BL,Q
DATA STR/' ',BL/' ',Q/'-'/'
100 FORMAT(8I10)
200 FORMAT(' ',119A1)
300 FORMAT('ANZAHL KAESTCHEN QUER,HOEHE DFR KAESTCHEN(ZEILEN),ANZ,SEIT
    3EN')
400 FORMAT('1')
    WRITE(16,300)
    READ(0,100) KZ,KH,ISZ
C   ZEILENSCHLEIFE
    DO 1111 I=1,119
        QSTR(I)=Q
1111 SSTR(I)=BL
C   KZ=KAESTCHENBREITE
        KZ=119/KZ
    DO 1000 I=1,119,KZ
C   KAESTCHENSCHLEIFE (BREITE)
1000 SSTR(I)=STR
C   REST
        J=(119/KZ)*KZ+2
        IF(J.GT.119)GOTO 2000
        DO 2000 K=J,119
            QSTR(K)=BL
2000 CONTINUE
C   KS=ANZ DER KAESTCHEN/SPALTE
        KS=(71/(KH+1))
C   SEITENSCHLEIFE (DRUCKSCHLEIFE)
        DO 3000 IS=1,ISZ
            WRITE(96,400)
            WRITE(96,200)QSTR
            DO 3002 IK=1,KS
                DO 3001 JK=1,KH
3001 WRITE(96,200)SSTR
3002 WRITE(96,200)QSTR
3000 CONTINUE
            WRITE(96,400)
            WRITE(96,400)
        STOP
    END
/*
```

Abb. 26: Programm Tabel

2.8.3.2. Dial

Das Programm Dial wandelt einen vom Dialysiergerät erzeugten Streifen in ein computergerechtes Format. Dieser neu erzeugte Streifen kann mit dem Programm Scatch (siehe 2.8.3.3.) weiter verarbeitet werden.

Das Dialysiergerät besteht aus mehreren Kammern mit je zwei Zellen, die voneinander durch eine semipermeable Membran getrennt sind. Vor Beginn der Dialyse pipettiert man in jeweils eine Zelle der Kammern eine konstante Menge Antikörper und dann in die dazugehörige andere Zelle eine konstante Menge markiertes und jeweils verschiedene Mengen kaltes Antigen. Nach der Dialyse befindet sich in der einen Zelle eine zum "Free"-Anteil gehörige Menge markiertes und nicht markiertes Antigen, und in der dazugehörigen anderen Zelle freies und an den Antikörper gebundenes "heißes" (d. h. radioaktives) und "kaltes" (d. h. nicht radioaktives) Antigen.

Die Aktivität in den Zellen, die den Antikörper enthalten, definiert man als Totals (T), die Aktivität in den dazugehörigen anderen Zellen als "Free" (F). "Bound" (B) ist jetzt $T - F$. Da es sich in der Praxis gezeigt hat, daß die Gesamtaktivität der einzelnen Zellen unterschiedlich ist, werden die "Bounds" (B-Werte) normiert, mit einem Faktor aus dem Quotienten der gemittelten und aktuellen Gesamtaktivität. Der Wert der gemittelten Gesamtaktivität erscheint am Bildschirm, weil er für das nachfolgende "Scatch"-Programm noch benötigt wird. Vor Berechnung der

Werte können einzelne "Ausrutscher" korrigiert werden. Die vom Dialysiergerät erzeugten Streifen haben die Reihenfolge: T, F, mit den dazugehörigen Mehrfachwerten in aufsteigenden Konzentrationen. Beim neuen Standardstreifen handelt es sich um den üblichen "Eichkurven-Lochstreifen", angefangen bei B_0 (O-Standard). Die unspezifische Bindung wird dabei gleich 0 gesetzt (Abb. 27).

```
PROGRAM DIAL
C  UMWANDELN EINES VOM DIALYSIER-GERAETES ERZEUGTEN STREIFENS
C  (REIHENFOLGE: T,F) IN STANDARD-LS=FORMAT ( N=0 )
1  FORMAT ('NRANF,NREND')
2  FORMAT (2I10)
3  FORMAT(3F10.)
4  FORMAT ('KORREKTUR:NR,CPM')
5  FORMAT ('TOTALS= ',F10.)
6  FORMAT (I10,I10,F10.)
   DIMENSION B(100),ICPM(100)
   WRITE(16,1)
   READ (0,2) NRANF,NREND
C  ANZAHL DER WERTE
   IZ=NREND-NRANF+1
C  CPM WERDEN VON 1 BIS IZ DURCHNUMMERIERT
   DO 100 I=1,IZ
   READ (64,3) CNR,ZEIT,CPM
   INR=I
100  ICPM(INR)=CPM
C  KORREKTURSCHLEIFE
150  WRITE (16,4)
   READ(0,3) CNR,CPM
   IF(CNR,EQ,0) GOTO 160
   INR=CNR-NRANF+1
   ICPM(INR)=CPM
   GOTO 150
160  J=0
   K=1
   TM=0
   DO 300 I=1,IZ,2
   TM=TM+ICPM(I)
300  CONTINUE
   TM=TM*2/IZ
C  GEMITTELTE GESAMTAKTIVITAET ERSCHEINT AM BILDSCHIRM
   WRITE (16,5)TM
200  J=J+1
   IF(K,EQ,IZ+1) GO TO 999
   IVB=ICPM(K)
   IVF=ICPM(K+1)
C  BERECHNUNG DER BOUND=WERTE
   BB=IVB-IVF
   T=IVB
   FAKT=TM/T
C  KORREKTUR DER BOUND=WERTE WEGEN UNTERSCHIEDLICHER GESAMTAKTIVITAET
   B(J)=BB*FAKT
   K=K+2
   IZEIT=1
   WRITE (80,6)J,IZEIT,B(J)
   WRITE(16,6) J,IZEIT,B(J)
   GOTO 200
999  WRITE(80,6) J,IZEIT,2
   WRITE(16,6) J,IZEIT,2
   STOP
   END
/*
```

Abb. 27: Programm Dial

2.8.3.3. Scatch

Dieses Programm dient zur Berechnung der "maximalen Bindungskapazität" und der "Assoziationskonstanten" eines Antikörpers unter Assay-Bedingungen mit Hilfe des Scatchard-Plots (57, 65). Bearbeitet werden die Counts eines Eichkurven-Lochstreifens. Dies läßt dann einen Schluß auf die Eigenschaften des verwendeten Antikörpers zu, auf die Assay-Bedingungen und auf das unterschiedliche Verhalten einzelner Antikörper-Populationen.

Es existierte bereits ein altes Programm zur Berechnung des Scatchard-Plots, das allerdings mit Mängeln behaftet war. So arbeitete es mit dem Platten- und nicht mit dem Kernspeicher. Es mußte also erst eine Datei zugewiesen werden. Sodann war der gesamte Bedienungskomfort und der Output ungenügend. Die Regression wurde zudem nicht von Einzelwerten, sondern von Mittelwerten berechnet und nur diese wurden gezeichnet. Zur Regressionsberechnung wurden die B_0 -Werte nicht verwendet.

Diese Probleme konnten mit dem neuen Programm gelöst werden. Es arbeitet mit dem Kernspeicher und verfügt über einen hohen Bedienungskomfort. Nach dem Anfangsdialog wird der Umrechnungsfaktor der Probenkonzentrationen von der Anlage berechnet. Nach dem Einlesen des Lochstreifens erfolgt eine mögliche Korrektur der Counts. Es werden zwei Unterprogramme verwendet. Das Subroutine "Puwo" zeichnet die berechneten Einzelpunkte der entsprechenden Kon-

zentrationen und nicht mehr die Mittelwerte. Man erkennt so schon optisch besser die Streuungen.

Das Subroutine "Regdat" berechnet die Regression zwischen den Einzelwerten verschiedener Konzentrationen. Eine Besonderheit dabei ist, daß das Programm automatisch alle denkbaren Kombinationen mit mindestens drei nebeneinander liegenden Koordinatenpunkten berechnet. Die Anzahl dieser Kombinationsmöglichkeiten ermittelt sich aus folgendem mathematischen Zusammenhang:

$$\sum_{i=1}^{n-2} i, \text{ dabei ist } n \text{ die Anzahl aller Koordinatenpunkte.}$$

Bei diesem Programm gehen die B_o -Werte ebenfalls in die Berechnung ein (siehe Abb. 28 a, b, c).

```

PROGRAM SCATCH
C   BERECHNUNG DER MAX. BINDUNGSKAPAZITAET UND DER
C   ASSOZIATIONSKONSTANTEN MIT SCATCHARD-PLOT
2  FORMAT('ANZ,B0,ANZ,PROBEN/STANDARD,ANZ,N: ')
3  FORMAT ('KONZENTRATIONSPOLGE(ONNE B0 UND N),ENDE I=0 :')
4  FORMAT ('UMRECHNUNGSFAKTOR IN (G/L),MOLEKULARGEWICHT :')
5  FORMAT ('EINGESETZTE TRACERKONZENTRATION (DIMENSION WIE PROBEN)',
5  GESAMTAKTIVITAET :')
6  FORMAT ('VIELFACHHEIT (ANZ, PROBEN/ZEILE),ANFANGSNUMMER :')
7  FORMAT ('ES WERDEN INSGESAMT',I4,'PROBEN ERWARTET','0,K. :')
8  FORMAT ('ERRECHNETER UMRECHNUNGSFAKTOR (NMOL/L)= ',E13,6/'MULTIPLI
8  KATOR ZUR VERMEIDUNG VON '/'RUNDUNGSFEHLERN = ',E8,1)
9  FORMAT (I4,'PROBEN EINGELESEN','KORREKTUR :')
10 FORMAT(BI10)
11 FORMAT (8F10,.)
12 FORMAT (E13,6,F10,.)
13 FORMAT ('WERT(ALT)=',F10,.)
14 FORMAT('1'/80X,'PROGRAM SCATCH'/' SCATCHARD-PLOT'/' BOUND/FREE'/'
15 FORMAT (80X,'B(=MOL.KONZ.DES GEB,AG+AG=)')/'1'/' ')
16 FORMAT ('
6
17 FORMAT ('OGESAMTAKTIVITAET: ',34X,'T= ',F10,/'OUNSPEZ,BINDUNG: ',36
7X,'N= ',F10,/'OUMRECHNUNGSFAKTOR IN MOL/L : ',23X,'F= ',E13,6/'OMUL
7TIPLIKATOR ZUR VERMEIDUNG VON RUNDUNGSFEHLERN: ',2X,'M= ',E8,1/'OE
7INGESETZTE TRACERKONZENTRATION AG=(MOL/L)*M: ',4X,'C= ',E13,6/'
18 FORMAT ('OZAEHLRATEN (ABZUEGLICH N)')/'0 I',5X, 'B
8OUND',9X,'FREE',3X,'BOUND/TOTALS',3X,'ANTIGEN(MOL/L)*M',3X,'BOUND/
8FREE',10X,'B'//)
19 FORMAT (I3,F10,.,F13,.,6X,F9,3,4X,E13,6,F12,3,F17,3)
20 FORMAT (I4,I4,F11,3,E14,4,10X,E12,5)
21 FORMAT (3E11,4)
22 FORMAT ('NEUSTART(ABBRUCH=-1,NUR PROBEN=0,NEUE KONZ.=1):')
23 FORMAT ('1'/'1')
24 FORMAT('1'/' VON BIS',7X,'R',7X,'ASS,KONST.',9X,'MAX,BIND,KAP. '/')
25 FORMAT (' ')
C   B=BOUND, F=FREE, C=KONZENTRATION, WF=B/F + MOL.KONZ. DES GEB, AG'S
REAL B(100),F(100),C(100),WF(100,2),E(3),D(3),PX(2,2),PY(2,2)
REAL REG(100,2)
INTEGER*2 IP(100,2)
INTEGER DIM,VBO,VST,VN
90 WRITE (16,2)
C   ANFANGSDIALOG
READ (0,10) VBO,VST,VN
IEND=VBO
WRITE (16,3)
100 READ (0,11) CONC
IF (CONC.LE.0) GOTO 110
ISTART=IEND+1
IEND=IEND+VST
DO 101 I=ISTART,IEND
101 C(I)=CONC
GOTO 100
110 ISTOP=IEND+VN
MEND=IEND
WRITE (16,7) ISTOP
READ (0,10) IOK
IF (IOK) 999,90,111
111 WRITE (16,4)
READ (0,12) GFAKT,WMO
C   BERECHNUNG DER UMRECHNUNGSFAKTOREN
UFAKT=GFAKT/WMO
RUND=ALOG10 (UFAKT)
RUND=AINT (RUND)*(-1,.)
RFAKT=10.**RUND
WRITE (16,8) UFAKT,RFAKT
DO 121 I=1,IEND
121 C(I)=C(I)*UFAKT*RFAKT
130 WRITE(16,5)

```

Abb. 28a: Programm Scatch

```

      READ (0,12) TRKONZ,TOTAL
      IF (TOTAL,LE,0) GOTO 999
      DO 120 I=1,V80
120  C(I)=0
      TRKONZ=TRKONZ+UFAKT*RF AKT
      IEND=MEND
      WRITE(16,6)
      READ (0,10) IVF,INR
      ANR=INR
      IF (IVF,LE,0) GOTO 999
      IF (IVF,GT,10) GOTO 135
      IF (IVF,GT,3) GOTO 130
      J=0
C      EINLESEN DES LOCHSTREIFENS
131  READ (64,11) P,T,(E(I),I=1,IVF)
      IF(P,LT,ANR) GOTO 131
      DO 132 I=1,IVF
      J=J+1
132  B(J)=E(I)
      IF (J,LT,ISTOP) GOTO 131
      GOTO 140
135  IVD=IVF-10
      IF (IVD,GT,3) GOTO 130
      J=0
136  READ (64,11) P,(D(I),I=1,IVD),EE
      IF(P,LT,ANR) GOTO 131
      J=J+1
      B(J)=EE
      IF (J,LT,ISTOP) GOTO 136
E      ENDE EINLESESCHLEIFE
C      KORREKTURSCHLEIFE
140  WRITE(16,9)J
141  READ (0,10) KOR
      IF (KOR,LE,0) GOTO 150
      WRITE (16,13) B(KOR)
      READ (0,11) WKOR
      IF(WKOR) 150,141,142
142  B(KOR)=WKOR
      GOTO 141
150  IN=0
      CN=0
      JEND=IEND+1
      DO 151 I=JEND,ISTOP
      IN=IN+1
151  CN=CN+B(I)
      CN=CN/IN
      XMAX=0
      YMAX=0
      DO 152 I=1,IEND
      F(I)=TOTAL-B(I)
      B(I)=B(I)-CN
C      ORDINATE
      WF(1,2)=B(I)/F(I)
C      ABSZISSE
      WF(1,1)=(B(I)/(TOTAL-CN))*(TRKONZ+C(I))
      IF (XMAX,LT,WF(1,1)) XMAX=WF(1,1)
      IF(YMAX,LT,WF(1,2)) YMAX=WF (1,2)
152  CONTINUE
      XMIN=0
      YMIN=0
      WRITE (96,14)
C      SUBROUTINE PUWO ZEICHNET EINZELPUNKTE
      CALL PUWO (WF,100,IP,IEND,XMAX,XMIN,YMAX,YMIN,PX,PY)
      WRITE (96,15)
      WRITE (96,16)
      WRITE (96,17) TOTAL,CN,UFAKT,RFAKT,TRKONZ
      WRITE (96,18)
      DO 200 I=1,IEND

```

Abb. 28 b: Programm Scatch, Fortsetzung

```
CC=TRKONZ+C(I)
BT=B(I)/(TOTAL-CN)
WRITE (96,19) I,B(I),F(I),BT,CC,WF(I,2),WF(I,1)
IF (I.LT.VB0) GOTO 200
IF (I.EQ.VB0.OR.MOD(I-VB0,VST).EQ.0) WRITE (96,25)
200 CONTINUE
WRITE(96,24)
165 K=1
WRITE (96,25)
170 JR=0
DO 160 I=K,IEND
JR=JR+1
REG(JR,1)=WF(I,1)
160 REG (JR,2)=WF(I,2)
C SUBROUTINE REGDAT BERECHNET REGRESSION
C ES WERDEN ALLE DENKBAREN KOMBINATIONEN DURCHLAUFEN
C UND DABEI MIND. 3 NEBENEINANDERLIEGENDE WERTE ZUSAMMENGEFASST
CALL REG DAT (REG,100,JR,VX,VY,VKO,XM,YM,R)
WK=VKO/VX
X0=XM-YM/WK
WK=WK*RFKAT*(-1)
X0=X0/RFKAT
WRITE (96,20) K,IEND,R,WK,X0
IF(K,EQ,1) K=VB0+1-VST
K=K+VST
IF(K,GT,IEND-(3+VST)+1) GOTO 180
GOTO 170
180 IEND=IEND-VST
IF(K,LT,VB0+2+VST) GOTO 900
GOTO 165
900 WRITE (16,22)
READ (0,10)NEUST
IF (NEUST) 999,130,90
999 WRITE (96,23)
STOP
END
/*
```

Abb. 28 c: Programm Scatch, Fortsetzung

SCATCHARD-LOT
BUNNENFREI

PROGRAM SCATCH

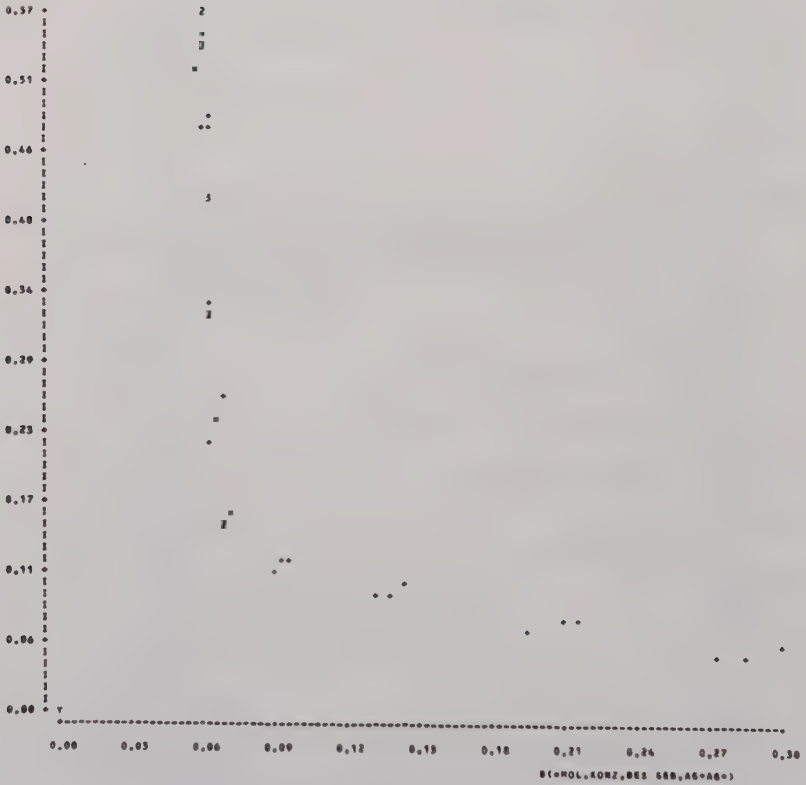


Abb. 29 a: Output, 1. Seite (Scatchard-Plot)

Der Output (= Ausdruck) des neuen Programms wird am Beispiel eines Calcitonin-Antikörpers gezeigt. Wir erhielten diesen von Professor Ziegler aus Ulm. Er wurde dort zu diesem Zeitpunkt nicht für Assay-Zwecke eingesetzt.

Auf der ersten Seite des Ausdrucks (Abb. 29 a) sieht man den graphischen Zusammenhang. Auf der Ordinate ist Bound/Free aufgetragen, auf die Abszisse die molare Konzentration des gebundenen markierten und kalten Antigens multipliziert mit einer rechnerinternen Größe. Es werden die Einzelwerte der entsprechenden Konzentrationen gezeichnet. Dabei stellen die Zahlen Koordinatenpunkte dar, die so dicht beieinander liegen, daß sie vom Drucker nicht mehr aufgelöst werden können. Man erkennt zwei Steigungen, dabei entspricht die steilere den Standards der Eichkurve, die im steilen Bereich liegen. Die zweite Steigung, die wohl eine andere Bindungsstelle des Antikörpers charakterisiert, zeichnet sich durch höhere Kapazität und geringere Affinität aus. Die Bindungskapazität ist der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der X-Achse.

Auf der 2. Seite (Abb. 29b) wird ausgedruckt: Die Gesamtaktivität, die unspezifische Bindung, der Umrechnungsfaktor in mol/l, der rechnerinterne Multiplikator zur Vermeidung von Rundungsfehlern und die eingesetzte Tracer-Konzentration. Tabellarisch ausgedruckt wird Bound, Free, Bound/Totals, das Antigen, Bound/Free und die molare Konzentration des gebundenen heißen und kalten Antigens, mit dem Multiplikator multipliziert. In Gruppen zusammengefaßt werden die Einzelwerte zu den entsprechenden B_0 -Werten bzw. zu den Konzentrationen.

GESAMTAKTIVITAET: T= 55000,
 UNSPEZ.BINDUNG: N= 2501,
 UMRECHNUNGSFAKTOR IN MOL/L : F= 0,277778E-09
 MULTIPLIKATOR ZUR VERMEIDUNG VON RUNDUNGSFEHLERN: M= 0,1E+10
 EINGESETZTE TRACERKONZENTRATION AG=((MOL/L)*M): C= 0,166666E+00

ZAEHLRATEN (ABZUEGLICH M)

I	BOUND	FREE	BOUND/TOTALS	ANTIGEN(MOL/L)*M	BOUND/FREE	B
1	18498.	34000.	0,352	0,166666E+00	0,544	0,059
2	18033.	34463.	0,344	0,166666E+00	0,523	0,057
3	18478.	34020.	0,352	0,166666E+00	0,543	0,059
4	19087.	33411.	0,364	0,166666E+00	0,571	0,061
5	19045.	33453.	0,363	0,166666E+00	0,569	0,060
6	18718.	33780.	0,357	0,166666E+00	0,554	0,059
7	16993.	35500.	0,324	0,188333E+00	0,479	0,061
8	16899.	35599.	0,322	0,188333E+00	0,475	0,061
9	17120.	35378.	0,326	0,188333E+00	0,484	0,061
10	15499.	36999.	0,295	0,210000E+00	0,419	0,062
11	15420.	37078.	0,294	0,210000E+00	0,416	0,062
12	15539.	36959.	0,296	0,210000E+00	0,420	0,062
13	12930.	39568.	0,246	0,253333E+00	0,327	0,062
14	12945.	39553.	0,247	0,253333E+00	0,327	0,062
15	12998.	39500.	0,248	0,253333E+00	0,329	0,063
16	9562.	42937.	0,182	0,340277E+00	0,223	0,062
17	10148.	42350.	0,193	0,340277E+00	0,240	0,066
18	10593.	41900.	0,202	0,340277E+00	0,253	0,069
19	6923.	45570.	0,132	0,513888E+00	0,152	0,068
20	7077.	45422.	0,135	0,513888E+00	0,156	0,069
21	7368.	45130.	0,140	0,513888E+00	0,163	0,072
22	5608.	46890.	0,107	0,861110E+00	0,120	0,092
23	5420.	47072.	0,103	0,861110E+00	0,115	0,089
24	5741.	46757.	0,109	0,861110E+00	0,123	0,094
25	4580.	47918.	0,087	0,155555E+01	0,096	0,136
26	4363.	48135.	0,083	0,155555E+01	0,091	0,129
27	4801.	47697.	0,091	0,155555E+01	0,101	0,142
28	3796.	48702.	0,072	0,294444E+01	0,078	0,215
29	3431.	49067.	0,065	0,294444E+01	0,070	0,192
30	3706.	48794.	0,071	0,294444E+01	0,076	0,208
31	2714.	49782.	0,052	0,572222E+01	0,055	0,296
32	2569.	49929.	0,049	0,572222E+01	0,051	0,280
33	2675.	50025.	0,047	0,572222E+01	0,049	0,270

Abb. 29 b: Output, 2. Seite (Scatchard-Plot)

VON BIS	R	ASS.KONST.	MAX,BIND,KAP,
1 33	-0,690	0,1809E+10	0,25877E-09
7 33	-0,698	0,1387E+10	0,27212E-09
10 33	-0,712	0,1145E+10	0,28353E-09
13 33	-0,751	0,8820E+09	0,30263E-09
16 33	-0,814	0,6369E+09	0,33431E-09
19 33	-0,932	0,4365E+09	0,38504E-09
22 33	-0,967	0,3362E+09	0,43221E-09
25 33	-0,951	0,2867E+09	0,46553E-09
1 30	-0,683	0,2711E+10	0,19820E-09
7 30	-0,687	0,2059E+10	0,21003E-09
10 30	-0,698	0,1683E+10	0,22026E-09
13 30	-0,732	0,1268E+10	0,23806E-09
16 30	-0,784	0,8734E+09	0,27026E-09
19 30	-0,910	0,5433E+09	0,33087E-09
22 30	-0,939	0,3731E+09	0,40260E-09
1 27	-0,705	0,5068E+10	0,13846E-09
7 27	-0,704	0,3834E+10	0,14671E-09
10 27	-0,712	0,3115E+10	0,15377E-09
13 27	-0,743	0,2307E+10	0,16636E-09
16 27	-0,780	0,1520E+10	0,19107E-09
19 27	-0,912	0,8440E+09	0,24595E-09
1 24	-0,769	0,1204E+11	0,95847E-10
7 24	-0,753	0,9157E+10	0,10041E-09
10 24	-0,755	0,7412E+10	0,10431E-09
13 24	-0,781	0,5401E+10	0,11136E-09
16 24	-0,783	0,3365E+10	0,12664E-09
1 21	-0,871	0,3304E+11	0,74496E-10
7 21	-0,832	0,2781E+11	0,75799E-10
10 21	-0,802	0,2246E+11	0,77633E-10
13 21	-0,772	0,1541E+11	0,81565E-10
1 18	-0,790	0,3598E+11	0,73441E-10
7 18	-0,683	0,2871E+11	0,75487E-10
10 18	-0,575	0,1910E+11	0,80502E-10
1 15	-0,782	0,4254E+11	0,71714E-10
7 15	-0,893	0,8312E+11	0,66742E-10

Abb. 29 c: Output, 3. Seite (Scatchard-Plot)

Auf der letzten Seite wird ausgedruckt (siehe Abbildung 29 c): Der Korrelationskoeffizient, die Assoziationskonstante (= der negative reziproke Wert der Steigung der Regressionsgeraden) und die maximale Bindungskapazität (= der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der X-Achse). Es sind Gruppen zusammengefaßt mit den in der Einführung angedeuteten verschiedenen Kombinationen zwischen den Einzelwerten.

2.8.4. Ergebnisse

2.8.4.1. Qualitätskontrolle

Die Präzision einer Methode beschreibt man durch den Variationskoeffizienten innerhalb einer Testserie (= Intrassay-Variationskoeffizient) und zwischen verschiedenen Testserien (= Interassay-Variationskoeffizient). Der Variationskoeffizient ist definiert als Standardabweichung in Prozent des Mittelwertes bei Mehrfachbestimmungen (12).

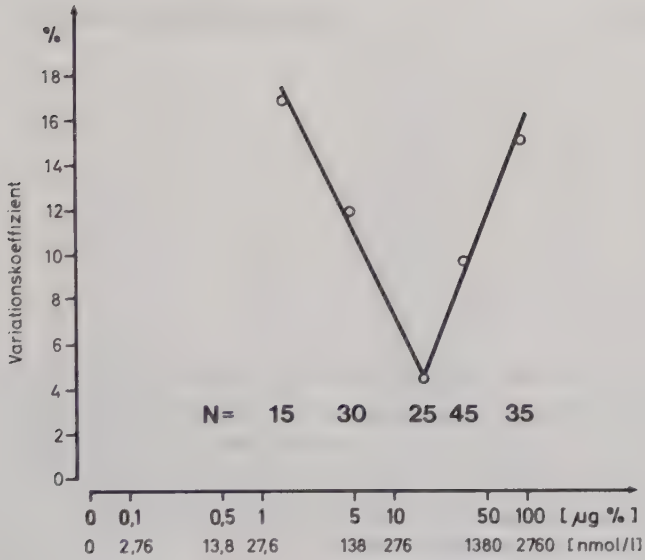


Abb. 30: "Parabelprofil" der Intraassay-
Variationskoeffizienten

Tabelle 2 zeigt den Intraassay-Variationskoeffizienten bei fünf verschiedenen Serumkonzentrationen.

Tabelle 2

$\bar{x} \pm s$ ($\mu\text{g}\%$)	VK (%)	N
1,46 $\pm$ 0,24	16,40	15
4,40 $\pm$ 0,53	11,96	30
16,48 $\pm$ 0,75	4,52	25
34,42 $\pm$ 3,34	9,69	45
83,25 $\pm$ 13,32	15,19	35

Im steilen Eichkurvenbereich liegt das Optimum mit einem Variationskoeffizienten von knapp über 4 %, der, je nachdem, ob man sich dem oberen oder unteren Teil der Eichkurve nähert, natürlich ansteigt, so daß sich die typische Parabelform ergibt (siehe Abb. 30).

Der Interassay-Variationskoeffizient betrug für ein Kontrollserum ($17,4 \pm 1,9 \mu\text{g}\%$ ($\bar{x} + s$)) bei $N = 33 : 10,5 \%$

Einem Serum mit niedrigem, noch meßbarem Cortisol-Spiegel wurden in steigender Menge Eichstandards zugesetzt. Die Wiederfindequoten der bekannten Mengen kalten Cortisols betrugen im Bereich von 1 - 50 $\mu\text{g}\%$:
 $95,7 \pm 7,2 \%$ ($\bar{x} \pm s$) bei 15 Proben.

Die Werte von Patientenserum mit Nullserum (siehe 2.8.2.4.) geometrisch verdünnt liegen jeweils auf einer Geraden.

100		Cortisol
I	0,4	Cortison
■	3,5	Corticosteron
I	< 0,01	11- Desoxycorticosteron
■	3,4	Progesteron
I	< 0,01	11 OH-Progesteron
I	< 0,01	Öestradiol
I	< 0,01	Öestron
I	< 0,01	Öestriol
I	< 0,01	Androstendion
I	1,4	Pregnenolon
I	1,2	Testosteron
I	1,0	Prednisolon
■	12,3	Prednison
■	18,0	Methylprednisolon
I	0,6	Dexamethasone
I	< 0,01	Bethamethason
■	8,0	Fludrocortison
■	1,5	Fluocortolon
I	0,3	Triamcinolon
I	< 0,01	Spironolacton
I	< 0,01	Carbenoxolon

Abb. 31: Spezifität des Antiserums K 9

Eingezeichnet ist die Mitreaktion endogener und therapeutisch eingesetzter Steroide in Prozent der Cortisolreaktion (= 100 %)

2.8.4.2. Spezifität

Abbildung 31 zeigt die Spezifität des Antiserums bzw. die Kreuzreaktion mit anderen Steroiden von K 9. Ein-gezeichnet sind die Prozent der Mitreaktion im Ver-gleich zur Cortisolreaktion (100 %) von verschiedenen endogenen und therapeutisch eingesetzten Steroiden (siehe 2.8.2.2.).

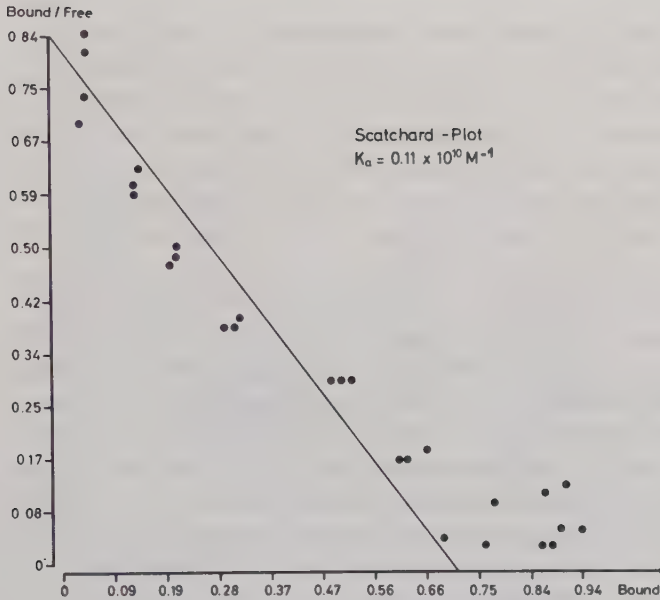


Abb. 32: Scatchard-Plot des Cortisolantiserums K 9
unter Assaybedingungen

Abszisse: Molare Konzentration des gebundenen
markierten und kalten Antigens,
multipliziert mit einem Rechner-
internen Faktor (10^9)

K_a = Assoziationskonstante

2.8.4.3. Affinitätsstudien

Abbildung 32 zeigt einen Standard-Plot unter Assaybedingungen (K 9): Ein Rechenprogramm dazu wurde eigens entwickelt (siehe 2.8.3.3.). Auf die Ordinate aufgetragen ist der Quotient aus gebundenem und freiem Hormonanteil, auf die Abszisse die molare Konzentration des gebundenen markierten und unmarkierten Antigens multipliziert mit einer rechnerinternen Größe.

Aus der Steilheit der Regressionsgeraden ergibt sich die Assoziationskonstante, aus dem Schnittpunkt dieser Geraden mit der Abszisse berechnet sich die maximale Bindungskapazität. Die Antikörperpopulation, die von der eingezeichneten Geraden charakterisiert wird, hat bei einem Regressionskoeffizienten der Einzelwerte von -0,97 eine Assoziationskonstante von $0,11 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ mit einer maximalen Bindungskapazität von $0,71 \times 10^{-9} \text{ mol/l}$.

2.8.4.4. Kapazität

Die Kapazität der Methode ist genügend groß. Ein Beispiel zeigt die Abb. 33: 200 Seren (Cortisoltagesprofil) von Patienten unter oraler Glucosebelastung (21 a) wurden in einem Assay bestimmt. Mit Kontrollseren und Eichstandards waren es, bei Dreifachbestimmungen, etwa 700 Proben.

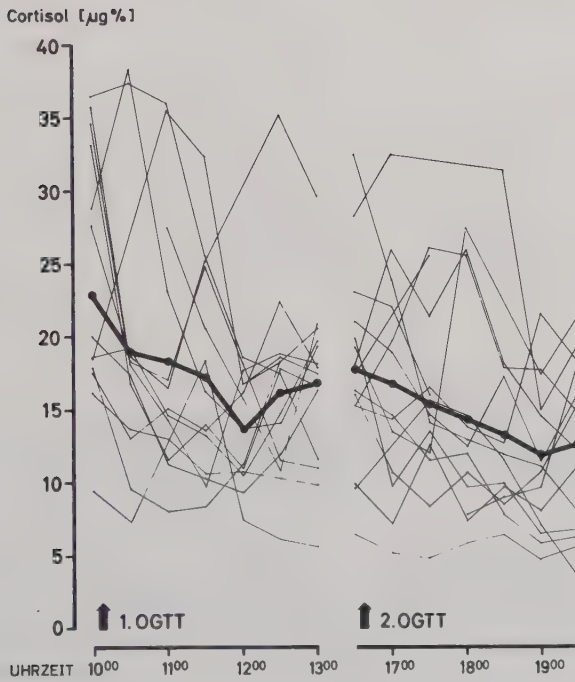


Abb. 33: Cortisoltagesprofil bei Patienten
unter oraler Glucosebelastung

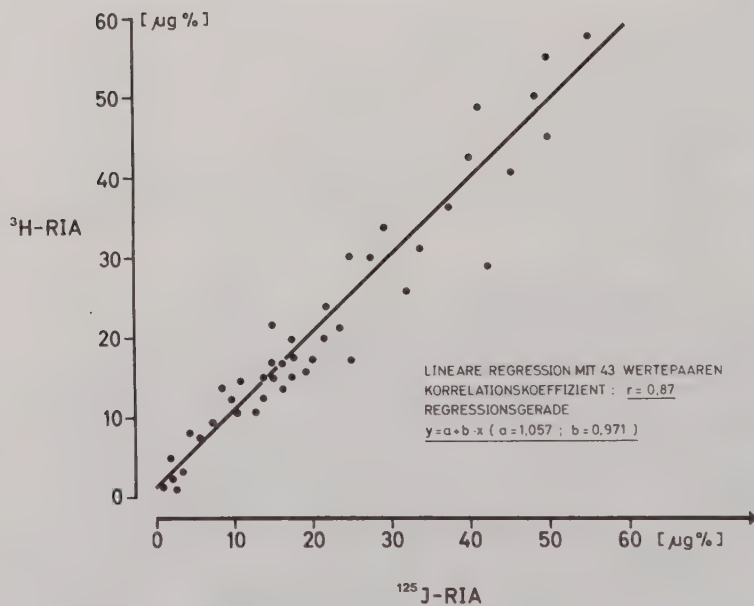


Abb. 34: Lineare Regression und Korrelation
mit 43 Wertepaaren
 Abszisse: $^{125}\text{J-RIA}$; Antiserum Kuss
 Ordinate: $^3\text{H-RIA}$

2.8.4.5. Vergleich verschiedener Methoden und Antiseren

Bei Parallelmessungen mit der von uns bisher eingesetzten radioimmunologischen Cortisolbestimmung mittels simultaner Säulenchromatographie (7) unter Einsatz eines Tritium-Tracers ergibt sich eine befriedigende Korrelation von 0,87. Abb. 34 zeigt die lineare Regression bei 43 Wertepaaren. Die Regressionsgerade lautet:

$$y = a + b \cdot x \quad (a = 1,057; b = 0,971)$$

Die etwas höheren Werte bei der Tritiummethode haben vielleicht eine Erklärung in der schlechteren Spezifität des Antiserums.

Tabelle 3 zeigt das Kontrollserum bei beiden Methoden. Der Mittelwert des Kontrollserums entspricht praktisch dem Mittelwert, der mit unserer früher eingesetzten Methode ermittelt wurde.

Tab. 3

	Kontrollserum	
	³ H-RIA	¹²⁵ J-RIA
N	24	33
$\bar{x}$ (µg%)	17,1	17,4
s (µg%)	2,1	1,9
VK (%)	12,3	10,5

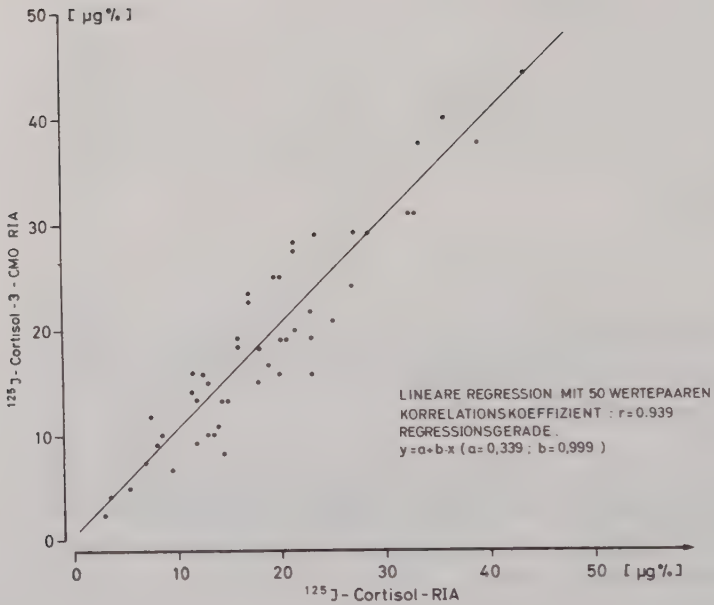


Abb. 35: Lineare Regression und Korrelation mit 50 Wertepaaren

Abszisse: Antiserum Kuss

Ordinate: Antiserum K 9

Abb. 35 zeigt die Korrelation des Antiserums K 9 mit dem Antiserum von Professor Kuss (siehe 2.8.2.2.) bei 50 Wertepaaren, die am gleichen Tag mit den gleichen Reagenzien bestimmt wurden.

Die Regressionsgerade lautet $y = a + b \cdot x$ mit $a = 0,34 \mu\text{g\%}$ und $b = 0,99$. Dabei repräsentiert y die K 9- und x die Kuss-Werte. Der Korrelationskoeffizient r betrug 0,94 mit einer hohen Signifikanz der Wertepaare von $p < 0,001$.

2.8.4.6. Normalkollektiv

Ohne besondere Belastungen variiert die Plasma-Cortisol-Konzentration beim Gesunden innerhalb bestimmter Grenzen in einer festgelegten Tagesrhythmik (50, 60). Die Cortisolkonzentration ist dabei direkt von der Plasmakonzentration des ACTH abhängig, die ebenfalls tageszeitlichen Schwankungen unterliegt. Die höchste Konzentration ist morgens zwischen 6.00 und 9.00 Uhr. Parallel dazu steigt um diese Zeit auch der Plasmaspiegel von Cortisol und fällt mit der Plasmakonzentration von ACTH kontinuierlich ab, bis ungefähr gegen Mitternacht ein Tiefpunkt erreicht ist.

Die Blutentnahmen für unser Normalkollektiv erfolgten deshalb zu einem festgesetzten Zeitpunkt (9.00 Uhr). Wir bestimmten den Cortisolspiegel in Seren von stoffwechselgesundem Klinikpersonal.

Die Werte lagen im Bereich zwischen 5,5 und 21,5 $\mu\text{g}\%$.
Wir errechneten einen Mittelwert von $14,3 \pm 5,5 \mu\text{g}\%$
Cortisol ($\bar{x} \pm s$, $N = 31$).

$$\bar{x} \pm S = 14,3 \pm 5,5 \mu\text{g}\%$$

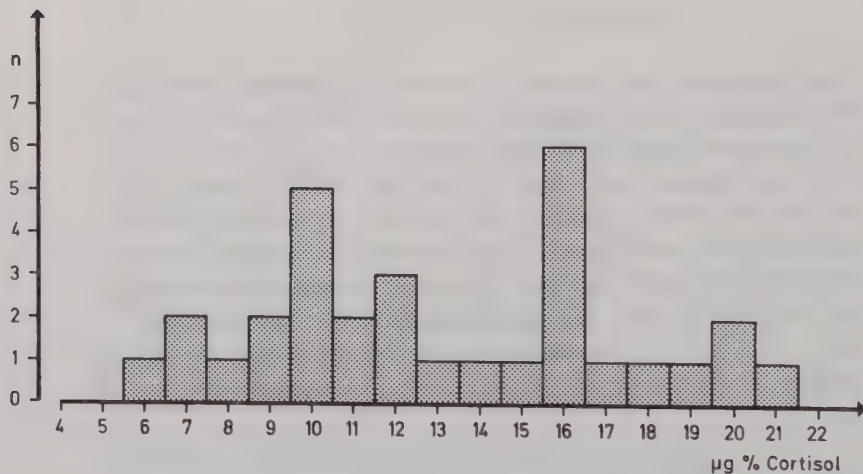


Abb. 36: Cortisol-Normalkollektiv

Graphische Darstellung der Verteilung der
linearen Einzelwerte ($N = 31$)

Abbildung 36 zeigt die Verteilung der linearen Einzelwerte bei einem Normalkollektiv von 31. Nach früheren Untersuchungen (27) müßten etwa 100 Personen untersucht werden, um eine Normalverteilung zu erzielen, wobei sich aber die Grenzen des Normalbereiches praktisch nicht mehr ändern würden.

2.8.5. Diskussion

2.8.5.1. Cortisolverbindungen

Unsere Methode (75) zur Herstellung eines C₃-CMO-Derivates haben wir bereits mit Erfolg auch bei Testosteron und Progesteron angewandt. Von den endogenen Steroiden gibt es knapp 20 mit Carboxylgruppen bei C₃, auf die man das Methodenprinzip ebenfalls übertragen könnte.

Mit der DC und IR-Spektroskopie haben wir zwei Untersuchungen, mit denen wir sehr schnell eine Aussage über Reinheit und Selektivität der Substanz bzw. der Umsetzung machen können. Wir haben bewußt andere Kriterien und weitere analytische Verfahren wie Schmelzpunktbestimmung, Analyse, Massenspektrum, NMR- und UV-Spektrum nicht aufgeführt, da sie nichts über die Selektivität der CMO-Umsetzung aussagen.

Bei der Kopplung des Cortisol-3-CMO mit der Aminosäure bzw. dem TG ist wegen der höheren Umsetzung (2, 75) und der geringeren Nebenwirkungen der gemischten Anhydrid-Methode der Vorzug zu geben.

Der Tracer war nach einer Markierung über zwei Monate, bis er aufgebraucht war, im Einsatz. Er verfügte über eine sehr gute Maximalbindung und eine niedrige unspezifische Bindung und ergab eine gute Empfindlichkeit im Assay. Die Markierung funktioniert in der beschriebenen Weise gut. Allerdings geht sie mit einem hohen Arbeitsaufwand einher. Selbst wenn man das jodierbare Derivat schon in den Händen hat und die Reinigung bereits bei der ersten Auftrennung zu einem brauchbaren Tracer führt, benötigt man etwa drei Tage.

Das Antiserum K 9 hat eine hervorragende Spezifität, ein Bindungsoptimum bei $\text{pH} = 4$ und einen guten Titer und liefert eine empfindliche Eichkurve.

Mit der reduktiven Aminierung wollten wir in einer Reaktion ein stabiles Derivat (z. B. Cortisol-3-Tyrosin) herstellen, das sich direkt ohne einen aufwendigen weiteren Reaktionsschritt markieren läßt und das auch zur Antigenherstellung geeignet ist, da es über eine Carboxylgruppe verfügt. Leider führte dieses Reaktionsprinzip noch nicht zum Ziel. Untersucht werden muß noch der Einfluß unterschiedlicher H^+ -Konzentrationen auf die Synthese mit Natriumcyanoborhydrid als Reduktionsmittel.

2.8.5.2. Radioimmunoassay

Durch Einsatz eines Cortisolantiseraums, das bei $\text{pH} = 4$ eine hohe Affinität zum Cortisol hat (Assoziationskonstante $= 3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$) und damit eine Extraktion des Cortisols aus dem Serum überflüssig macht (Assoziations-

konstante des CBG zum Cortisol bei $\text{pH} = 4 : 0 \text{ M}^{-1}$), sowie durch Verwendung eines ^{125}J -Tracers und eines optimierten Doppelantikörperprinzips konnten wir den Assay mit Hilfe eines modularen Analysensystems automatisieren (74).

Die Methode erfüllte die notwendigen Richtigkeitskriterien, der Variationskoeffizient, der die Präzision des Cortisolassays angibt, lag im steilen Bereich bei 4,5 %, die Wiederfinderate betrug $95,7 \% \pm 7,2 \% (\bar{x} \pm s)$, verschiedene Serumverdünnungen lagen auf der Eichkurve. Der Assay zeigte eine befriedigende Spezifität, die Kapazität reicht zur Bewältigung großer Probenzahlen aus. Wir haben gezeigt, daß bei diesem Assay sogenanntes "synthetisches" Serum verwendet werden kann, was eine wertvolle Hepatitisprophylaxe im Labor darstellt.

Selbstverständlich ist dieses Methodenprinzip sicherlich auch auf andere automatische oder semiautomatische Analysensysteme zu adaptieren und mit anderen Cortisol-Antisera durchzuführen.

Cortisol kommt im Serum im Vergleich zu manchen anderen Hormonen in viel höherer Konzentration vor, z.B. etwa 400 - 2000 mal höher als Calcitonin. Die Empfindlichkeit des Assays war nie ein Problem, eher daß er zu empfindlich war. Aus diesem Grunde setzten wir nur $3 \mu\text{l}$ Serum pro Probe ein, sowie den spezifischen Antikörper in relativ konzentrierter Form.

3. CALCITONIN

3.1. Einführung

Das Calcitonin wurde 1961 von COPP und CAMERON (13) entdeckt. Seine Struktur ist 1968 von NEHER und Mitarbeitern (18, 30) aufgeklärt worden. Es ist ein lipophiles Polypeptid, mit einem Molekulargewicht von ca. 3600, das aus 32 Aminosäureresten besteht. Calcitonin anderer Spezies (26) enthalten bis zu 207 Aminosäurereste, wobei die Sequenz signifikant variiert.

Humanes Calcitonin wird in den parafollikulären Zellen (= C-Zellen) der Schilddrüse gebildet, die vom letzten Kiemenbogen abstammen. Es wird dort bei steigendem Serumcalciumgehalt sezerniert (70). Sinkt der Serumcalciumgehalt, erfolgt ein Anstieg des Antagonisten Parathormon.

Die genaue physiologische Rolle des Calcitonin beim Menschen ist unsicher. Bis jetzt ist noch kein Krankheitsbild beschrieben worden, welches auf Calcitoninmangel zurückzuführen sein könnte. Die Hauptangriffspunkte des Hormons sind das Skelett, die Nieren und der Magendarmtrakt. Es hemmt dabei den ostioklastischen Umbau und die tubuläre Phosphatrückresorption. HCT hat eine Bedeutung als Tumormarker und für die Diagnostik bei medullären Schilddrüsen-Carcinomen (39, 72, 81).

Seit der Einführung eines Radioimmunoassays für menschliches Calcitonin (hCT) (16, 78) sind folgende Probleme nicht völlig zufriedenstellend gelöst worden:

1. Die Inkubationszeiten, gewöhnlich mehrere Tage bis zu einer Woche (16, 78).
2. Die Empfindlichkeit der Methode erfordert in der Regel einen Extraktionsschritt, um die Werte bei Normalpersonen erfassen zu können (34).
3. Die Trennung; es wurde eine unspezifische Trennung von freiem und gebundenem Hormon eingesetzt (79).

Das Ziel dieser Untersuchungen war es, diese methodischen Probleme zu lösen, d. h. eine Methode zu entwickeln, die innerhalb von 24 Stunden, ohne Extraktion und mit einer spezifischen und schnellen Trennung zu einem Ergebnis führt. Außerdem untersuchten wir in einer zwölfmonatigen klinischen Studie hCT-Spiegel bei Patienten mit medullärem Schilddrüsenkarzinom, Bronchialkarzinom und Calciumstoffwechselstörungen.

3.2. Methodik und Vorversuche

3.2.1. Material

Diäthylbarbitursäure	Merck, Darmstadt
Donkey-anti-sheep/goat-Serum	Wellcome, Darmstadt
Florisil	Serva, Heidelberg
γ -Globulin (sheep/goat)	Miles Pentex, Frankfurt
1-32 Humanes Calcitonin	Ciba-Geigy, Schweiz
Latex	Serva, Heidelberg
Trasytol	Bayer, Leverkusen
Tween 20	Serva, Heidelberg
Ultrogel Aca 54, 34	LKB, Gräfelfing

0,5 M Na-Phosphatpuffer pH=7,65

6,81 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)
werden in 100 ml Aqua bidest. gelöst.

44,5 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)
werden in 500 ml Aqua bidest. gelöst.

Zur Na_2HPO_4 -Lösung wird die KH_2PO_4 -Lösung zugegeben,
bis pH = 7,65 erreicht ist.

Puffer 2

Barbitalpuffer

20,62 g Diäthylbarbitalsäure in 1000 ml Aqua bidest. lösen.
Von dieser Lösung 812 ml plus 188 ml 0,1 n HCl ergibt
0,1 molare Lösung.

500 ml 0,1 molaren Puffer plus 500 ml Aqua bidest. er-
gibt 1000 ml 0,05 molaren Puffer. Dieser wird auf pH = 7,4
eingestellt und versetzt mit 10 g Humanserum-Albumin,
200 mg Merthiolat, $5 \cdot 10^5$ KIU Trasytol^R.

0,1 M Ammoniumacetatpuffer pH = 4,5

7,70 g Ammoniumacetat werden in 1 l H₂O gelöst: Lösung A
0,1 M Essigsäure (6 g/l): Lösung B
Der gewünschte Puffer ergibt sich aus:
40 Teile A + 60 Teile B.

Die Gewinnung und Aufbewahrung des zu untersuchenden Serums erfolgt wie in 2.8.2.1.5. beschrieben. Ein Abweichen von dieser Vorschrift hatte z. B. beim O-Serum (siehe 3.2.3.) einen Verlust von Immunoreaktivität zur Folge, d. h. die Bindung im Assay sank und es kam zu falsch hohen Werten.

Kalter Hormonstandard

1 Ampulle (= 500 µg) hCT₁₋₃₂ wird in 1 ml 0,01 M Essigsäure aufgelöst. Davon werden 300 µl in je 10 µl Portionen in Eppendorfgefäße zur Markierung (siehe 3.2.4.) verteilt. 100 µl + 4,9 ml "hCT-freies" Serum ergibt die Stammlösung für den kalten Hormonstandard. 100 µl (10 µg/ml) dieser Stammlösung ergibt mit 9,9 ml "hCT-freiem" Serum eine Lösung von 100 µg·l⁻¹. Dies wurde noch einmal 1 : 10 verdünnt. Ausgehend von der Konzentration 10 µg · l⁻¹ stellten wir durch Überpipettieren im "hCT-freien" Serum eine Verdünnungsreihe für die Standardkurve her, mit den Konzentrationen:
10/ 5/ 2,5/ 1,25/ 0,625/ 0,312/ 0,156/ 0,078 µg · l⁻¹

Die Proteinlösungen werden in 300 μ l-Portionen bei -20°C zuerst tiefgefroren und dann lyophilisiert (siehe 2.2.2.3.). Die so behandelten Standards können beliebig lange gelagert werden. Bei Bedarf werden sie mit Aqua bidest.wieder in Lösung gebracht.

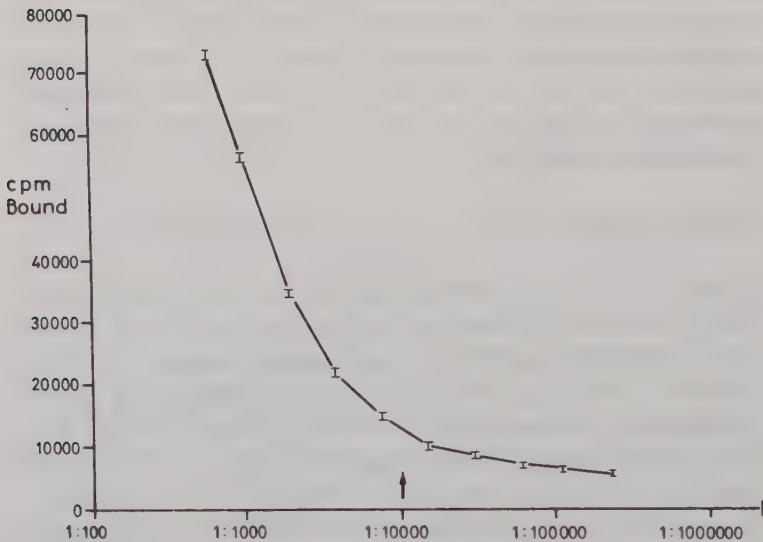


Abb. 37: Verdünnungskurve des spezifischen Antiserums

Abszisse: Verdünnungsfaktor

Der Pfeil kennzeichnet die für den Assay gewählte Anfangsverdünnung.

T = 82.000 cpm, Inkubationszeit 6 Stunden bei 4°C

3.2.2. Spezifisches Antiserum

Das Antiserum mit der Verschlüsselung 030377 überließ uns dankenswerterweise Herr Professor R. Ziegler, Ulm. Es wurde in einer Ziege durch Immunisierung mit synthetische, 1-32 hCT erzeugt (62). Abb. 37 zeigt die Antikörperverdünnungskurve nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden bei 4°C. Für den Assay wählten wir eine Anfangsverdünnung von 1 : 10 000. Dies entspricht einem Verhältnis von B/T von 0,18 - 0,25 in Abhängigkeit von Qualität und Alter des verwendeten Tracers.

Abb. 38 zeigt die Kinetikstudie der Tracerbindung für einen 0 bzw. einen 2,5 µg x liter⁻¹ Standard über eine 7-Stunden-Periode nach 15 Stunden kalter Vorinkubation (siehe 3.2.8.) bei 4°C. Nach diesen Ergebnissen inkubierten wir den Tracer 4,5 Stunden. Eine 15-stündige Vorinkubation wurde zur Empfindlichkeitssteigerung durchgeführt, die auch für andere Peptidhormone (22) erzielt werden konnte. Aus Rationalisierungsgründen wurde die Vorinkubation über Nacht durchgeführt.

Wir untersuchten auch die Beschleunigung der Reaktion des 1. Ak durch Zugabe von PEG (6 mg/Ansatz), wie es für den TSH-Assay gezeigt werden konnte (89). Beim hCT-RIA führte dies allerdings zu keinem positiven Ergebnis.

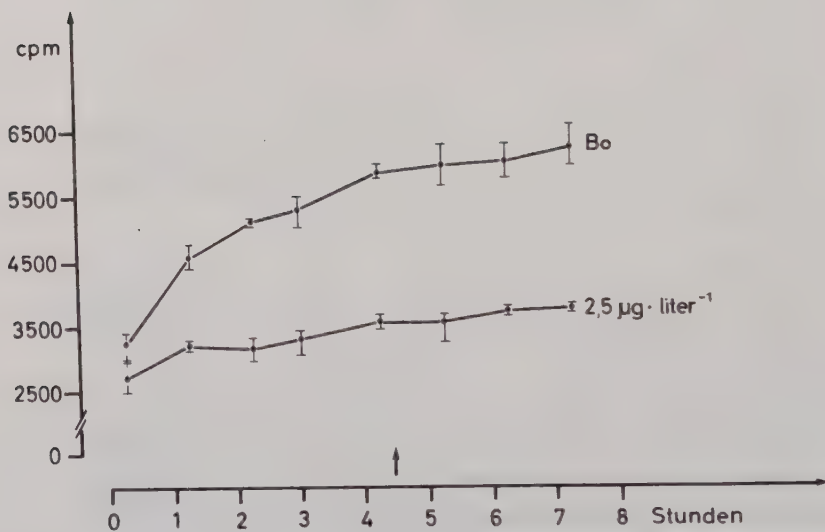


Abb. 38: Kinetik der Tracerbindung
bei 4°C und 15 Stunden kalter Vorinkubation
für B_0 und $2,5 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ -Standard
Der Pfeil kennzeichnet die für den Assay
gewählte Inkubationszeit

3.2.3. Calcitonin-freies Serum

Zur Standardverdünnung verwendeten wir "hCT-freies" Serum (siehe 3.2.1.). Dazu nehmen wir entweder ein Patientenserum mit an der Pufferkurve nicht meßbarem hCT-Spiegel oder ein mit Florisil extrahiertes Serum. Florisil ist ein Magnesiumtrisilikat (18), das kleinere Moleküle adsorbiert. Die Abbildungen 39 a, b, c, d zeigen die Auswirkung bei Variation einer Komponente des Extraktionssystems. Das Ausgangssystem besteht aus dem 30-minütigen Schütteln einer Lösung aus 200 g Florisil in 1 Liter Serum bei Zimmertemperatur mit anschließendem Abzentrifugieren des Florisils. Der Lösung wird ^{125}J hCT zugegeben. Dabei bewegt sich die Tracerreinheit (Tracer ist 10 Wochen alt) zwischen 50 % und 60 %. Durch Säulenchromatographie berechnete sich eine Reinheit von 52 % und durch maximale Bindung bei Ak-Überschuß eine Reinheit von 58 %.

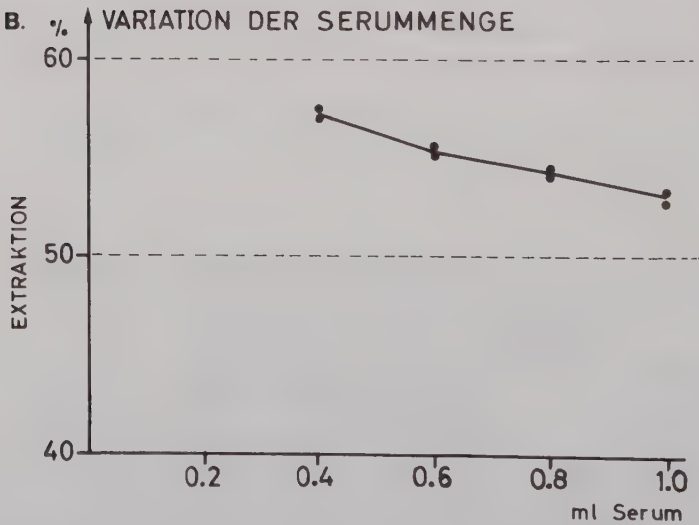
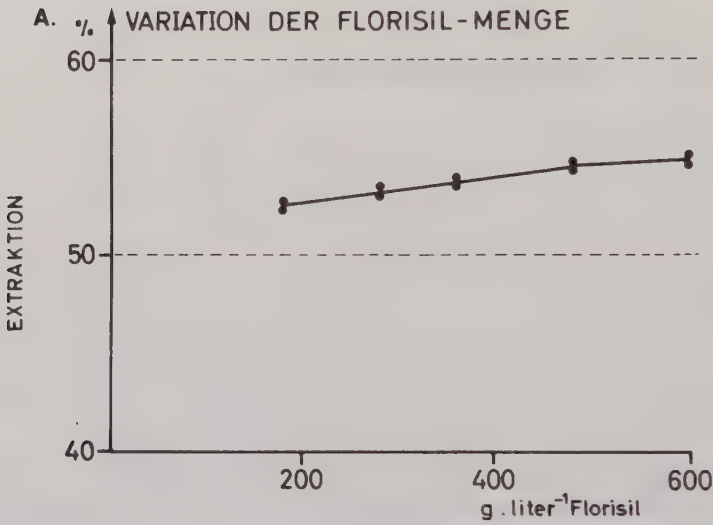


Abb. 39 a, b: Florisilextraktion

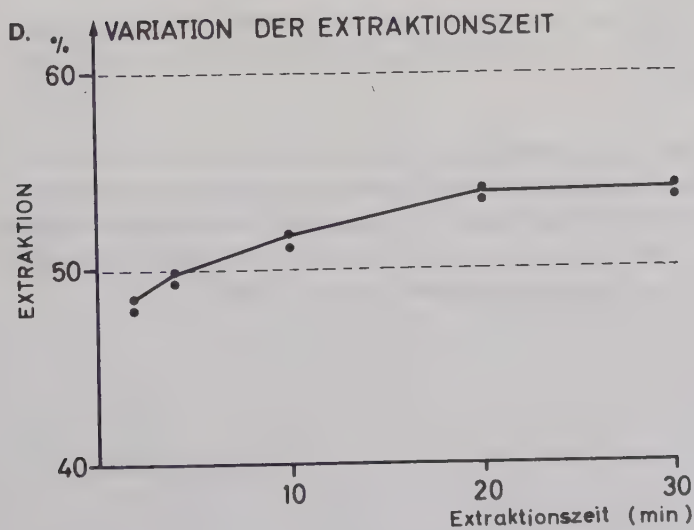
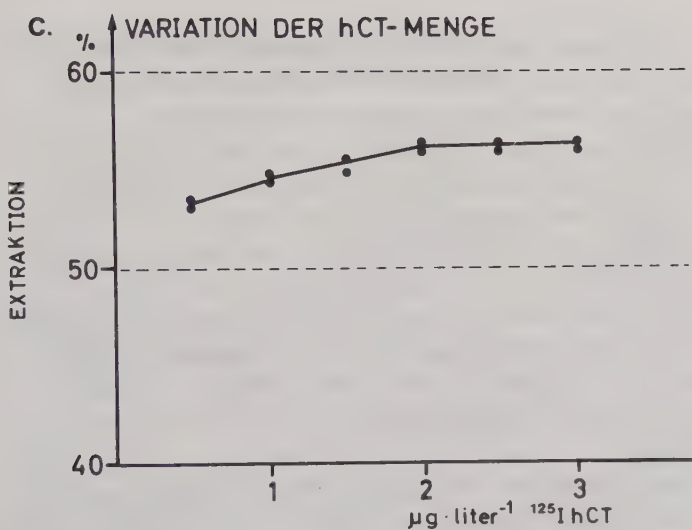


Abb. 39 c, d: Florisilextraktion

Abb. 39 a zeigt den Effekt der Änderung der hinzugefügten Florisilmenge. Eine Verdoppelung bzw. Verdreifachung der Basis-Florisilmenge führt also nur zu einer ganz geringen Verbesserung der Extraktion.

Abb. 39 b zeigt die Auswirkung auf die Extraktion bei Veränderung der Serummenge des Ausgangssystems. Eine Verringerung der zu extrahierenden Serummenge erbringt keine wesentliche Verbesserung der Extraktion.

Abb. 39 c zeigt die Veränderung der Extraktion bei Verdoppelung bzw. Verdreifachung der eingesetzten Tracer-menge ($1 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$). Auch eine größere hCT-Menge führt zu keiner wesentlichen Verschlechterung der Extraktion.

Abb. 39 d zeigt den Einfluß der Extraktionszeit. Es wird mit dieser Methode ein Plateau bereits nach 20 Minuten erreicht.

Alle vier Abbildungen zeigen, daß Florisil immunoreaktives hCT in den zu erwartenden Grenzen (50 - 60 %) extrahiert.

Tabelle 4 veranschaulicht den Einfluß der Florisilextraktion auf Elektrophorese und die Konzentrationen mehrerer Serumbestandteile. Im Gegensatz zur Charcoalextraktion (59) (siehe 2.8.2.4.) bleiben die Proteinbestandteile des Serums weitgehend unbeeinflusst.

Tab. 4: Verschiedene Serumbestandteile vor
und nach Florisilextraktion

Bestandteile	vor Behandlung	nach Behandlung
Gesamteiweiß	66 g.Liter ⁻¹	62 g.Liter ⁻¹
Albumin	65,9 relative %	67,2 relative %
α_1 -Globulin	3,0 "	2,9 "
α_2 -Globulin	6,6 "	5,9 "
β - Globulin	8,4 "	8,0 "
γ - Globulin	15,9 "	15,7 "
Kreatinin	80 μ mol.Liter ⁻¹	53 μ mol.Liter ⁻¹
Harnsäure	276 " "	270 " "
Gesamtbilirubin	5,44 "	2,21 "
Cholesterin	4530 "	4280 "
Natrium	168 mmol.Liter ⁻¹	183 mmol.Liter ⁻¹
Kalium	15,4 "	8,4 "
Calcium	2,20 "	2,25 "

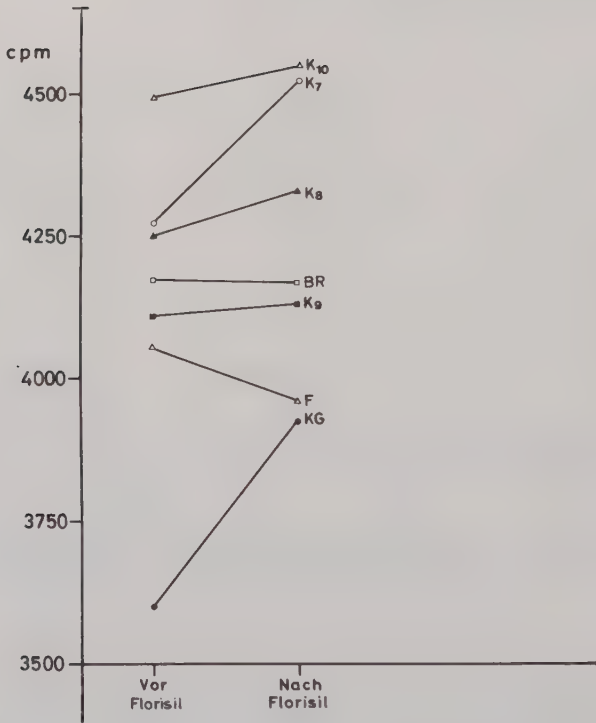


Abb. 40: Einfluß des Florisils auf
immunoreaktives hCT im Serum

Abb. 40 veranschaulicht den Einfluß des Florisils auf das immunoreaktive hCT, d. h. auf die gebundene Radioaktivität vor und nach Extraktion bei mehreren Serum- und Plasmaproben. B.R., R., K.G. sind Patientenserum und K₇ - K₁₀ sind veraltete Blutkonserven.

Man sieht, daß nicht alle Seren für die Florisilextraktion geeignet sind. Bei den Proben B.R. und F kann der Gehalt im immunoreaktiven hCT nach der Extraktion sicher nicht angestiegen sein. Vielmehr ist anzunehmen, daß Serumbestandteile, vielleicht des Komplementsystems (80), das die AG-AK-Reaktion steigert, herabgesetzt wurden.

3.2.4. Markierung

Als Tracer verwenden wir ein mit ¹²⁵J markiertes hCT₁₋₃₂. Es wird durch eine nach W. G. WOOD et al. für Parathormon (88) modifizierte Methode nach HUNTER und GREENWOOD (17) hergestellt (Prinzip siehe 2.5.12.1.).

Zur Markierung werden in ein Eppendorfgesäß pipettiert:

10 µl hCT (= 5 µg hCT, s. 3.2.1.)

100 µl Phosphatpuffer (0,5 M, pH = 7,65)

20 µl Na¹²⁵J in 0,5M Phosphatpuffer (37,17 MBq = 1 mCi)

10 µl Chloramin T (8,9 mM = 25 mg in 10 ml 0,5 M Phosphatpuffer) und nach 30 Sekunden Reaktionszeit

100 µl Na₂SO₅ (6,6 mM).

Zur Reinigung des markierten hCT vom freien ¹²⁵J wurde eine mit Puffer II (s. 3.2.1.) äquilibrierte Sephadex G 10-Säule verwendet, deren Volumen 9 ml betrug. Sephadex

G 10 (55) ist ein dreidimensionales Netzwerk hydrophiler Polysaccharidketten mit einer Ausschlußgrenze von 700 Molekulargewicht, d. h. kleinere Moleküle wie das freie ^{125}Jod erscheinen im Eluat erst zuletzt, weil sie die Gelperlen durchdringen.

Zur Ermittlung der Gesamtaktivität, d. h. der Radioaktivität von freiem und hormonegebundenem ^{125}Jod , wird das Reaktionsgefäß gezählt und dann wird der Inhalt mit einer Pasteurpipette auf die Sephadex-Säule aufgetragen. Das Reaktionsgefäß wird mit Puffer II nochmals gespült. Eluiert wird ebenfalls mit Puffer II. Gesammelt und anschließend gezählt werden Fraktionen von je 20 Tropfen, das entspricht etwa je 1 ml.

Abb. 41 zeigt das Elutionsprofil der Entsalzung auf einer Sephadex G-10-Säule. Zu sehen ist neben dem Proteinpeak nur noch der Jodid-Peak.

Der Proteinpeak wird zur Nachreinigung, um eventuell vorhandene Bruchstücke abzutrennen, auf eine 130 x 2,5 cm Ultrogel Ac-A 54-Säule aufgetragen, die mit 0,1 M Ammoniumacetatpuffer pH = 4,5 äquilibriert ist (siehe 3.2.1.). Ultrogel Ac-A 54 (55) trennt Moleküle nach unterschiedlichem Molekulargewicht bzw. -größe. Die Trennmatrix besteht aus einem Kopolymerisat von Acrylamid und Agarose. Gesammelt werden Fraktionen von je 80 Tropfen, das entspricht etwa 4 ml; gezählt werden davon Aliquots von 20 μl 15 Sekunden lang.

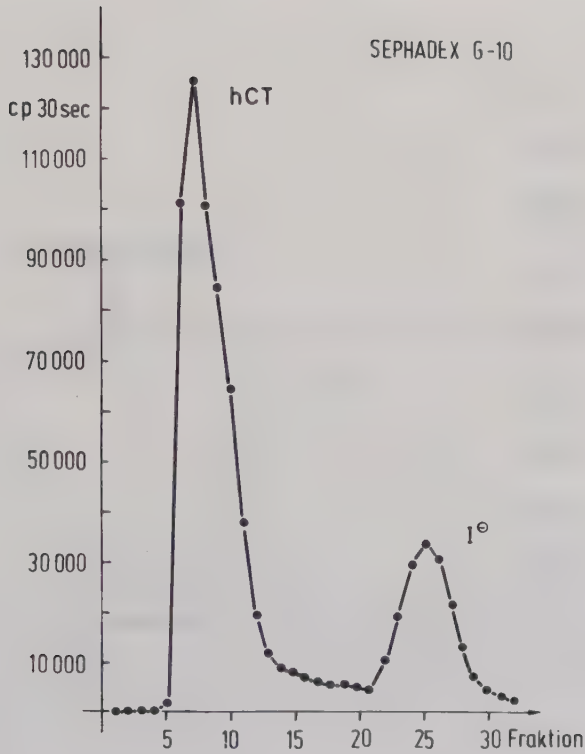


Abb. 41: Abtrennung des markierten hCT vom freien ¹²⁵Jod

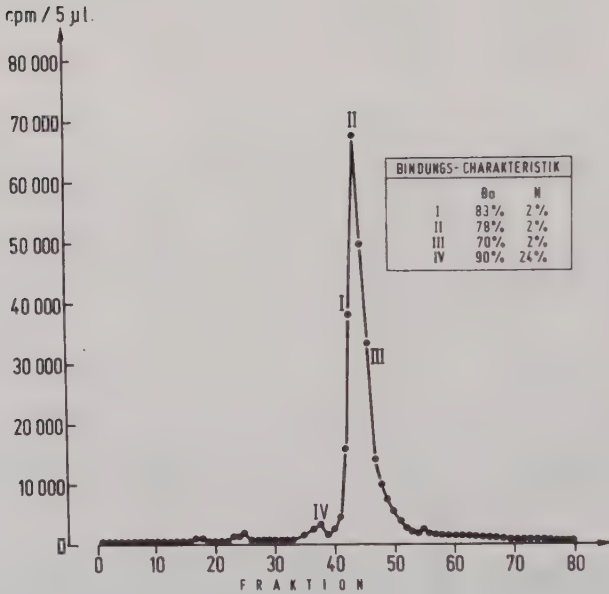


Abb. 42: Elutionsprofil des ^{125}J -hCT auf Ultrogel
Ac-A54 nach Sephadex G-10 Entsalzung
Antikörpermaximalbindung einzelner Fraktionen
(Inkubationszeit 6 Stunden, AK-Verdünnung 1:2000)

Die spezifische Aktivität errechnet sich aus der Aktivität des von der Sephadex G-10-Säule eluierten hCT-Peaks (Abb.41) und aus der eingesetzten Menge hCT. Die Gesamtaktivität beträgt 1 mCi, die Aktivität des hCT-Peaks ist 75 % $\hat{=}$ 750 μ Ci. Wenn man annimmt, daß das gesamte eingesetzte hCT markiert und auch das gesamte noch freie 125 Jod eluiert wird, errechnet sich eine spezifische Aktivität von 150 μ Ci/ μ g hCT.

3.2.5. Trennung von gebundenem und freiem Antigen

3.2.5.1. Doppelantikörpermethode

Das Prinzip dieser Methode ist ausführlich in 2.8.2.6.2. behandelt.

Als 2. Antiserum wurde Anti-Ziege/Schaf- γ -Globulin-Serum vom Esel verwendet. Es wurde bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt und für die klass. Doppelantikörperreaktion mit Puffer II bzw. 6 g% in 1 g% NaCl-Lösung für die optimierte Fällung (siehe 3.2.5.2.) auf die jeweilige Gebrauchsverdünnung gebracht. Für jede Charge dieses Antiserums mußte die optimale Verdünnung neu ausgetestet werden.

In Anlehnung an die radioimmunologische TSH-Bestimmung (22) wird dem Reaktionsgemisch zur Bildung eines Kopräzipitates γ -Globulin vom Schaf/Ziege zugesetzt. Zu diesem Zweck lösen wir 200 mg Schaf- γ -Globulin in 100 ml Puffer II. Davon geben wir 50 μ l pro Probe, um einen Pipettierschritt zu ersparen, zur Fällungslösung.

Die optimale Verdünnung des 2. Antiserums mußte für jede Charge neu ausgetestet werden. Hierzu wurden B_0 und unspezifische Bindungswerte erstellt, wobei 100 μ l des 2. AK in verschiedenen Verdünnungen dem Reaktionsgemisch zugegeben werden. Die Verdünnungsreihe reichte von 1 : 6 bis 1 : 32. In der Regel erreichten wir mit der Verdünnung von 1 : 16 die höchste Bindung, mit einem Plateau zwischen 1 : 12 und 1 : 20. Um eine möglichst günstige Inkubationszeit des 2. Antiserums zu ermitteln, wurde eine Bindungskinetik für B_0 und unspezifische Bindung bei 4°C und Zimmertemperatur für die ausgetestete Konzentration durchgeführt. Aufgrund dieses Ergebnisses inkubierten wir den 2. AK 2 Stunden bei Zimmertemperatur mit einem hinreichend breiten Plateau sowohl zur kürzeren als auch zur längeren Zeitspanne.

3.2.5.2. Optimierte Doppelantikörperfällung

Stellvertretend für andere Hormone wurde diese Methode beim Assay für hCT optimiert. Die jeweiligen Maximalbindungen (B_0) und die unspezifischen Bindungen (N) wurden für über 3 Stunden bei 4°C und Zimmertemperatur, für drei verschiedene AK_2 /PEG-Gemische ermittelt. Die bereits ausgetestete Menge AK_2 (siehe 3.2.5.1.) wurde konstant gehalten. Die PEG-Lösungen variierten von 4 bis 8 %.

Als Optimum, d. h. höchste Maximal- und geringste unspezifische Bindung erwies sich der Zusatz einer 6 g%igen PEG-Lösung bei 4°C.

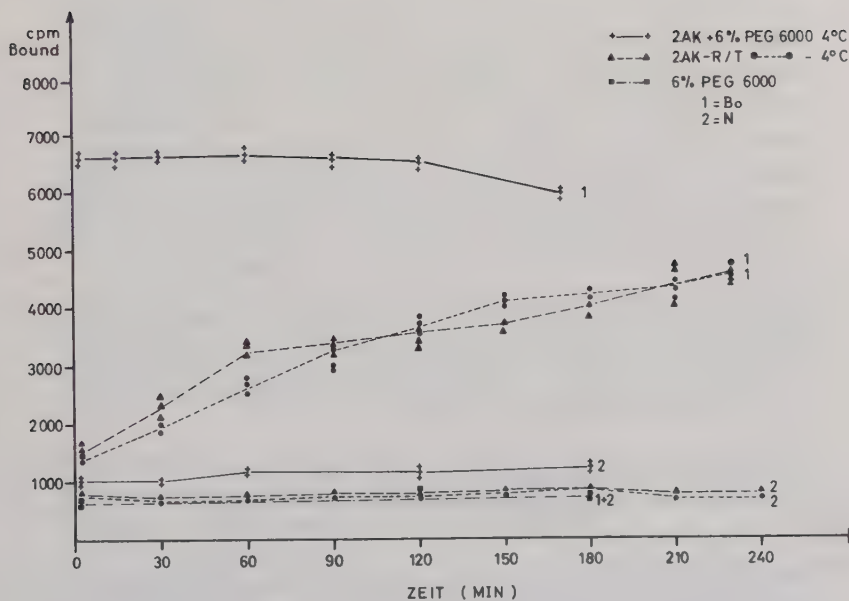


Abb. 43: Kinetiken der B/F-Trennung mit PEG (60 g/l) und 2. AK und 2. AK alleine

Der 2. AK wurde bei 4°C (▲—▲) und Zimmertemperatur (●—●) getestet, PEG mit (+—+) und ohne (■—■) 2. AK bei 4°C über 3 bzw. 4 Stunden.

R/T = Zimmertemperatur

Abb. 43 zeigt die Kinetik von hCT jeweils für eine reine Doppelantikörperfällung und für eine kombinierte Fällung. Eingetragen sind auch die Werte für die Fällung durch eine reine 6 g% PEG-Lösung ohne 2. AK-Zusatz. Die Werte für die Doppelantikörper-Technik erreichen erst nach 2 Stunden ein Plateau. Bei der kombinierten Technik erreichen die Werte sofort ein Plateau und die Komplexe sind über mehrere Stunden stabil, so daß diese Technik zeitunabhängig ist.

Bei der kombinierten Technik erreicht man eine viel höhere Maximalbindung bei gleicher oder geringerer unspezifischer Bindung (ungefähr 3 %) als bei der klassischen Doppelantikörper-Technik.

3.2.5.3. Trennung mit einem trägergebundenen 2. Antikörper

Ein Teil der Schwierigkeiten, die die klassische Doppelantikörpermethode aufweist, vor allem das Austesten optimaler Reaktionsbedingungen, kann umgangen werden, wenn ein 2. Antikörper verwendet wird, der zuvor an eine Trägersubstanz wie z. B. Sepharose oder Zellulose gebunden wurde. Durch mehrstündiges Mischen des fertig inkubierten Testansatzes mit der geeigneten Menge einer Suspension des trägergebundenen 2. Antikörpers und anschließendes Zentrifugieren erfolgt die Bindung des spezifischen Antikörpers und daran gebundenen Antigens an den trägergebundenen zweiten Antikörper.

Die γ -Globuline trennten wir vom Antiserum mit einer QAE Sephadex A-50 Säule (19, 41). Sephadex-Ionen-Austauscher werden aus den neutralen Sephadex-Typen durch Substitution mit funktionellen Austauscherguppen gewonnen. An diese Glukosebausteine der Dextransketten sind über Ätherbrücken die funktionellen Austauscherguppen, in unserem Fall quarternäres Aminoäthyl, gebunden. Dieser stark basische Ionenaustauscher hat eine Ausschlußgrenze von 200 000. Das QAE 50 wird mit einem 0,05 M Phosphatpuffer pH = 6,5 äquilibriert. Der selbe Puffer wird auch zur Elution verwendet. Die exakte Einstellung des pHs ist aufgrund der amphoteren Eigenschaft der Proteine von entscheidender Bedeutung.

3 ml des 2. Antiserums trägt man auf eine 5 ml-Säule auf und sammelt die ersten 4 ml Eluat, die die γ -Globuline enthalten.

Zur Bindung der γ -Globuline an Latex schüttelt man das folgende Reaktionsgemisch 5 Stunden bei Zimmertemperatur:

4 ml γ -Globulin-Eluat
6 ml Dow-Latex
10 ml 0,1 M NaHCO_3 pH = 9,0.

Danach wird das Gemisch zentrifugiert und der Niederschlag dreimal mit Puffer II, das erste Mal über Nacht, gewaschen. Der so gereinigte Niederschlag wird in 50 ml Puffer II aufgenommen und mit 0,5 ml Tween 20, zur Vermeidung von Wandadsorption, versetzt.

Wir testeten die Maximalbindung bei Zugabe verschiede-
ner Mengen (25 - 150 μ l) des trägergebundenen Anti-
körpers. Nach zweistündiger Inkubation bei 4°C und
Zimmertemperatur erhielten wir ein Optimum für 100 μ l
bei Temperaturunabhängigkeit.

Leider zeigte es sich, daß bei dieser Trennung die un-
spezifische Bindung so hoch (> 10 %) und die Bindung an
den AK₁-Komplex so stark pH-abhängig war und dadurch ge-
wissen Schwankungen unterworfen war, daß wir dieses Me-
thodenprinzip nicht weiter austesteten und es beim hCT-
RIA nicht mehr verwendeten.

3.2.6. Einfluß der Temperatur auf den Assay

Für 21 Wertepaare führten wir eine Vor- und Hauptinkuba-
tion bei 4°C und Zimmertemperatur durch, um den Einfluß
der Temperatur auf die Höhe der Bindung und die Streuung
der Werte zu untersuchen. Der Korrelationskoeffizient be-
trug 0,98.

Bei 4°C betrug der Mittelwert 7,95 μ g $\cdot$ Liter⁻¹ mit einer
Streuung der Werte von 10,17 % (VK) und einer Quadrat-
summe der Einzelwerte von 3101,8.

Bei Zimmertemperatur betrug der Mittelwert 6,69 μ g $\cdot$ l⁻¹
mit einer Streuung der Werte von 12,45 % (VK) und einer
Quadratsumme der Einzelwerte von 2071,2. Aufgrund dieses
Ergebnisses und der etwas geringeren Streuung wurde die
Inkubation bei 4°C durchgeführt.

3.2.7. Endgültiger Calcitonin-Radioimmunoassay

Tabelle 5 zeigt zusammengefaßt sämtliche Assaydetails, wie Vor- und Hauptinkubation, Trennung und Zählsschritte:

Tab. 5: Details des hCT-RIA

Vorinkubation 18 Stunden 4°C

100 µl Standard oder Serum

100 µl hCT Antiserum (1:10.000 Anfangsverdünnung) in Puffer II

Hauptinkubation 4,5 Stunden 4°C

100 µl ^{125}J -hCT in Puffer II (ca. 260 Bq)

Trennung 10 Minuten Zimmertemperatur

50 µl Schaf-γ-Globulin (10 µg)

50 µl Esel-anti Schaf-Antiserum (1:8 Anfangsverdünnung)
in Puffer II

500 µl PEG (M_r 6000 - 60 g x Liter⁻¹) in 1 g% NaCl-Lösung

Zentrifugieren 15 Minuten 3000 g 4°C

Zählen Niederschlag nach Absaugen des Überstandes

2 Minuten/Probe - 10.000 cpm beim 0-Standard

3.2.8. Eichkurve und Empfindlichkeit

Zur Auswertung der Meßwerte siehe 2.8.2.9.

Abb. 44 zeigt die Eichkurve des hCT-RIA in einem Bereich von 0 - 10 $\mu\text{g} \cdot \text{Liter}^{-1}$. Die untere Nachweisgrenze liegt in Höhe der geringsten Standardkonzentration (0,07 $\mu\text{g} \cdot \text{Liter}^{-1}$). Der 50 %-Intercept liegt bei 0,88 $\mu\text{g} \cdot \text{Liter}^{-1}$. Er schwankt in der Regel von 0,75 - 0,90 $\mu\text{g} \cdot \text{Liter}^{-1}$. Im Bereich von 0,3 - 6 $\mu\text{g} \cdot \text{Liter}^{-1}$ liegt der Variationskoeffizient unter 12 %.

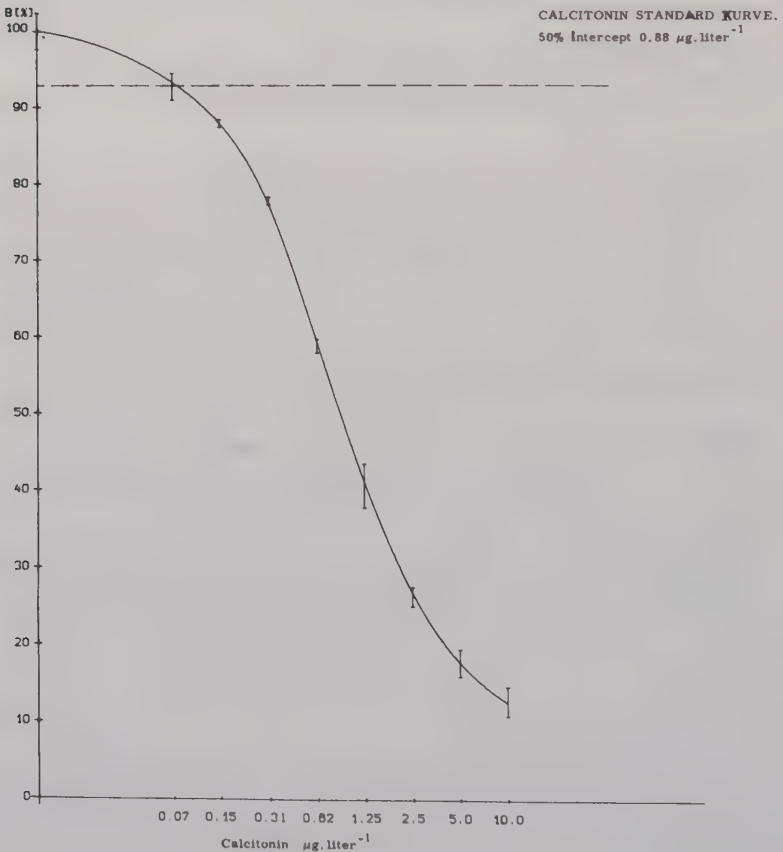


Abb. 44: Calcitonin Eichkurve $B = \frac{100 \cdot (B-N)}{B_0 - N}$

Die Empfindlichkeit des hCT-Ria steigerten wir durch folgende Bedingungen:

1. Durch richtige Wahl der Antiserumkonzentrationen.
Wir wählten sie pro Probe so, daß am Nullpunkt der Eichkurve (B_0 -Wert) der Tracer zu etwa 20 % gebunden wurde ($B/T \cdot 100$).
2. Durch Verringerung der Tracermenge, doch müssen dadurch längere Zählzeiten in Kauf genommen werden.
3. Durch Variation der Inkubationsbedingungen: Ist die Affinitätskonstante zwischen Antikörper und Antigen hoch und ist der Austausch von Tracer gegen bereits AK-gebundenes kaltes Hormon langsam, führt eine kalte Vorinkubation zu einer Empfindlichkeitssteigerung um den Faktor 5.
4. Durch Variation der Standard- bzw. Serumzugaben:
Der 50 %-Intercept sank von $2,86 \mu\text{g} \cdot \text{Liter}^{-1}$ bei $50 \mu\text{l}$ Serumzugabe auf $1,55 \mu\text{g} \cdot \text{Liter}^{-1}$ bei $100 \mu\text{l}$ und auf $1,09 \mu\text{g} \cdot \text{Liter}^{-1}$ bei $200 \mu\text{l}$. Diese frühere Studie wurde noch mit einer PEG-Fällung durchgeführt (siehe Abb. 45).

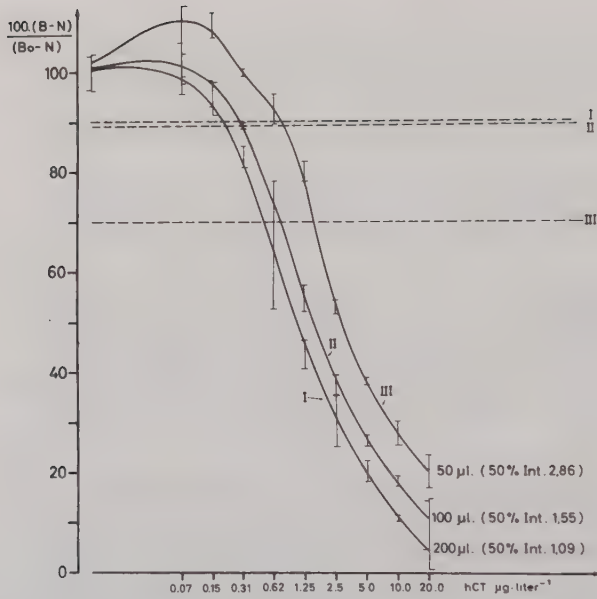


Abb. 45: Variation der Standardmenge

3.3. Ergebnisse

3.3.1. Qualitätskontrolle

Siehe dazu 2.8.4.1.

Wir ermittelten den Intraassay-Variationskoeffizienten für zwei Seren, einem in hohem und einem im mittleren Bereich. Tabelle 6 zeigt die Zahlenwerte.

	$\bar{x}$	s	V.K.	N
Serum 1	8,72 $\mu\text{g} \cdot \text{Liter}^{-1}$	1,07	12,3 %	25
Serum 2	0,81 $\mu\text{g} \cdot \text{Liter}^{-1}$	0,07	9,43 %	25

Tabelle 6: Intraassay-V.K.

Tabelle 7 zeigt den Interassay-Variationskoeffizienten über mehrere Monate für drei Kontrollseren.

Tab. 7: Interassay-V.K.

	$\bar{x}$	s	V.K.	N
Kontrollserum 1	0,14 $\mu\text{g} \cdot \text{Liter}^{-1}$	0,02	16,5 %	15
Kontrollserum 2	5,18 $\mu\text{g} \cdot \text{Liter}^{-1}$	0,63	12,3 %	15
Kontrollserum 3	9,66 $\mu\text{g} \cdot \text{Liter}^{-1}$	1,58	16,3 %	15

Einem Serum mit meßbarem hCT-Spiegel wurden in steigender Menge Eichstandards zugesetzt. Die Wiederfindequoten der bekannten Mengen kalten hCT. betrugen im Bereich von 0,15 - 10 $\mu\text{g} \cdot \text{Liter}^{-1}$: $99,8 \pm 13,3 \%$ ($\bar{x} \pm s$, N = 20).

Abb. 46 zeigt die geometrische Verdünnung zweier Seren von Patienten mit medullärem Schilddrüsenkarzinom. Serum A stammt von einem Dialysepatienten und Serum B von einem Patienten mit normaler Nierenfunktion. Beide Seren sind mit hCT-freiem Serum verdünnt. Die Ergebnisse zeigen Mittelwert und Standardabweichung von Dreifachwerten.

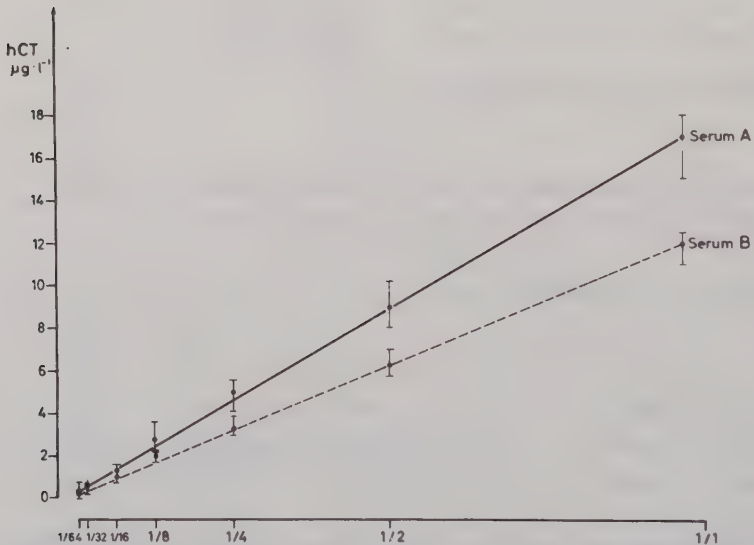


Abb. 46: Verdünnungstest

Patientenseren (A, B) werden mit O-Serum verdünnt.

Abszisse: Verdünnungsfaktor

3.3.2. Affinitätsstudien

Abb. 47 zeigt einen Scatchard-Plot unter Assaybedingungen. Ein Rechenprogramm dazu wurde eigens entwickelt (siehe 2.8.3.3. und 2.8.4.3.). Die AK-Population, die von der Regressionsgeraden a-a charakterisiert wird, hat eine Assoziationskonstante von $0,3 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$. Sie zeigt, warum der Assay in solch einer kurzen Zeit durchgeführt werden kann. Es ist noch eine 2. AK-Population (b-b) zu sehen, mit einer geringeren Assoziationskonstanten von $0,28 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ und einer höheren Kapazität.

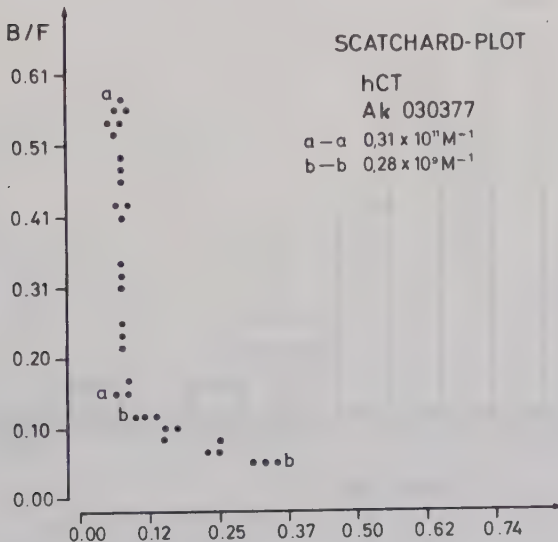


Abb. 47: Scatchard-Plot des Calcitonin-Antiserums unter Assaybedingungen

Abszisse: Molare Konzentration des gebundenen markierten und kalten Antigens, multipliziert mit einem rechnerinternen Faktor (10^9)

3.3.3. Klinische Studien

3.3.3.1. Normalkollektiv

Wir untersuchten ein Normalkollektiv von 53 Calciumstoffwechselgesunden Personen im Alter von 18 bis 67 Jahren.

Abb. 48 zeigt die Verteilung. Alle Personen lagen in einem Bereich von 0 - 0,3 $\mu\text{g} \cdot \text{Liter}^{-1}$ hCT.

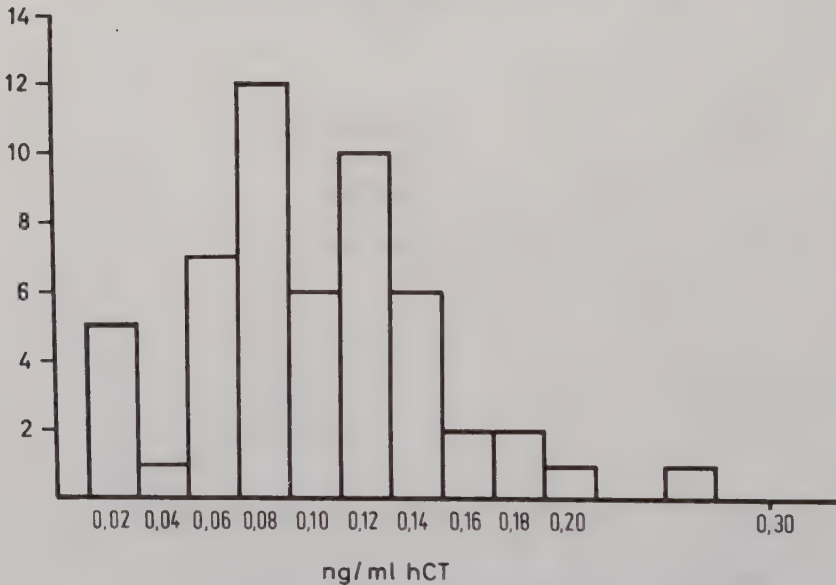


Abb. 48: Calcitonin-Normalkollektiv

Graphische Darstellung der Verteilung der linearen Einzelwerte ($N = 53$). Zwischen 0 und 0,3 $\mu\text{g} \cdot \text{Liter}^{-1}$ hCT liegen 100 % des Normalkollektivs

In Abb. 49 ist unter anderem die Trennung nach dem Geschlecht zu sehen. Unterschiede im hCT-Spiegel sind statistisch nicht signifikant ($p \leq 0,2$ Wilcoxon-Rank-Test).

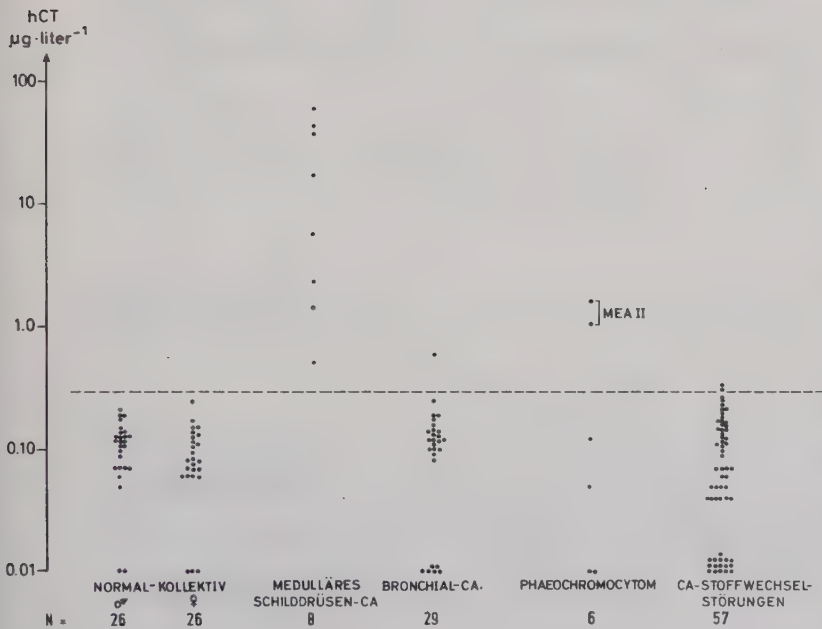


Abb. 49: hCT-Spiegel beim Normalkollektiv und
4 Patientengruppen

MEA II = multiple endokrine Adenomatose Typ II

3.3.3.2. hCT-Spiegel bei Patienten mit medullärem Schilddrüsen-Ca

Abb. 50 zeigt den Verlauf des hCT-Spiegels bei einer 72-jährigen Patienten mit einem metastasierenden medullären Schilddrüsen-Ca unter Chemotherapie mit Adriablastin und Bleomycin. Die Größe der Lungenmetastasen im Röntgenbild korrelierte recht gut mit den hCT-Werten. Die chemotherapeutische Behandlung mußte wegen schwerer Nebeneffekte im haematopoetischen System abgebrochen werden.

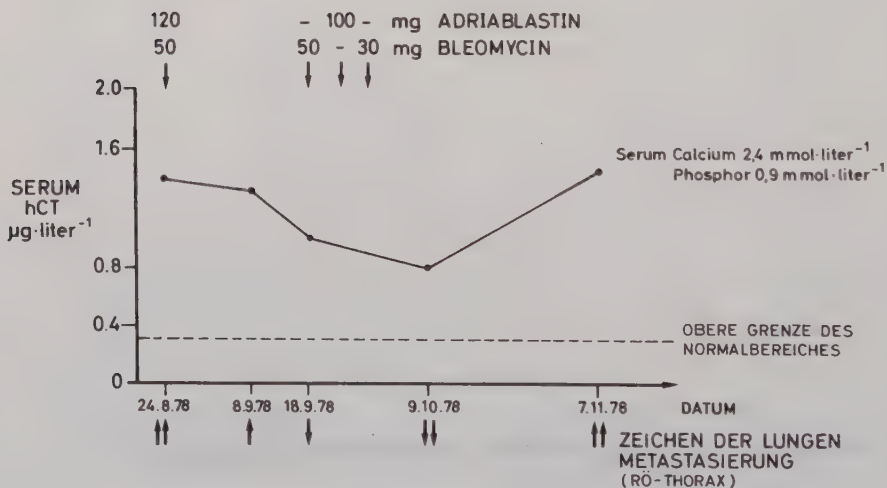


Abb. 50: hCT-Verlaufskontrolle nach Op eines medullären Schilddrüsen-Ca unter Chemotherapie
Pfeile symbolisieren die Häufigkeit und Größe der Lungenmetastasen im Röntgenbild

3.3.3.3. Calcitonin als Tumormarker

Abb. 50 zeigt die immunoreaktiven hCT-Spiegel beim Normalkollektiv, bei einer Gruppe von 8 Patienten mit medullärem Schilddrüsenkarzinom, bei 29 Patienten mit Bronchialkarzinom, bei 5 Patienten mit Phaeochromocytom und 57 Patienten mit Calcium-Stoffwechselstörungen wie Nierensteine bzw. Hyper- und Hypoparathyreoidismus.

Nur Patienten mit medullärem Schilddrüsenkarzinom und zwei Patienten mit einem zusätzlichen Paeochromocytom (multiple endokrine Neoplasie Typ II, Sipple-Syndrom) zeigten erhöhte hCT-Werte.

3.4. Diskussion

Obwohl der Assay zur Bestimmung von hCT im Serum keine allzu große klinische Bedeutung hat und demzufolge seine Durchführung nicht allzu häufig notwendig ist, ist der Bedarf für schnelle und sensitive Assays doch vorhanden, besonders was die Rationalisierung der Assayschritte betrifft (91, 92). Dies wird durch die theoretische Überlegung gestützt, daß es bei länger dauernden Assays durch die Degradation des Hormons zu falschen Ergebnissen kommt.

Die Höhe der Assoziationskonstante des hier verwendeten Antiserums ermöglicht einen solchen schnellen Assay ohne Verlust an Empfindlichkeit.

Die Verwendung von Trasylol im Puffersystem diene dazu, der Proteaseaktivität vorzubeugen oder sie zu behindern.

Es ist gezeigt worden, daß manche Assays, die nicht unter Gleichgewichtsbedingungen stattfinden, empfindlicher sind als solche unter Gleichgewichtsbedingungen (83), und dies verbessert zusammen mit der Vorinkubation die Beziehungen Empfindlichkeit und Assaydauer.

Der Einsatz einer unspezifischen Fällungstechnik mit PEG und seinen unspezifischen Effekten bei Dysproteinämiesen (90) wurde so lange benutzt, bis die Doppelantikörpermethode optimiert war (89). Der Nachteil der klassischen Doppelantikörpermethode war die langsame Kinetik

mit unserem Antikörper (89), die durch gleichzeitige Verwendung von PEG in einer Endkonzentration von 30 - 50 g · Liter⁻¹ in seiner Reaktionszeit auf Sekunden reduziert wurde, so daß die Methode genau so schnell wie PEG und schneller als Charcoal (16) war, ohne die Zeitabhängigkeit der letzten Proben. Mit der kombinierten Technik ließen sich die Fällungskinetiken für die Assays von Trijodthyronin, Thyroxin, Thyreotropin, Thyroxin-bindendem Globulin, Transferrin und β -Endorphin auch auf wenige Sekunden abkürzen. Die gleichzeitige Verwendung einer Doppelantikörpertechnik mit einem PEG-Zusatz, der keine eigene Fällungswirkung hat, zur Reaktionsbeschleunigung und höherer Maximalbindung bei gleicher Spezifität ist neu. Eine der Erklärungen, wahrscheinlich nicht die einzige, ist die katalytische Natur der Polyhydroxyl-Gruppen des PEG, die zu einer schnelleren Bindung eines präzipitierenden Komplexes zwischen erstem und zweitem Antikörper führt.

Die Fähigkeit des Assays hCT sorgfältig zu messen wird in dem Assay gezeigt, in dem die gemessenen Werte geometrisch verdünnter Seren neben den zu erwartenden lagen.

Die Gewinnung von hCT-freien Seren ist eine der Fragen, die bis jetzt noch nicht völlig gelöst sind. Man kann "hCT-freies" Serum durch Florisilextraktion herstellen, obwohl nicht alle Seren dazu geeignet sind.

Die Verwendung des hCT-Assays in der klinischen Diagnose ist intensiv erforscht worden, insbesondere bei Patienten

mit erhöhten hCT-Spiegeln bei medullärem Schilddrüsenkarzinom (77, 85) und bei anderen Tumoren (34, 72). In unserem Labor konnten wir erhöhte hCT-Spiegel nur bei Patienten mit medullärem Schilddrüsenkarzinom finden. Bei zwei Patienten, Mutter und Tochter, mit zusätzlichem Phaeochromocytom, das 12 Jahre bzw. 6 Monate vorher entfernt wurde, wurden erhöhte hCT-Spiegel gefunden. Es handelt sich also um eine multiple endokrine Neoplasie Typ II (76, 81). Bei den Patienten mit Bronchialkarzinom waren die ACTH-Spiegel ebenfalls in der Regel normal (53) im Gegensatz zu anderen Studien (29, 58). Eine Möglichkeit, diese Diskrepanz zu erklären, ist die Spezifität des verwendeten Antiserums, d. h. ob es sich um C- oder N-terminale Spezifität handelt (58). Eine zukünftige Studie muß die Spezifität gegen verschiedene Regionen des hCT noch untersuchen.

Die Verwendung des hCT-Assays mit diesem Antiserum begrenzt sich auf die Aufdeckung des medullären Schilddrüsenkarzinoms und als Suchmethode zur Erfassung der multiplen endokrinen Neoplasie Typ II, bei der die Produktion von hCT im Nebennierenmark und den C-Zellen der Schilddrüse vorkommen kann, weil beide gemeinsamen embryologischen Ursprungs sind (44).

4. ZUSAMMENFASSUNG

Zum Aufbau eines ^{125}J -Cortisol-Radioimmunoassays war zunächst die Präparation eines reinen Cortisol-Derivates (Cortisol-3-(O-Carboxymethyl)Oxim = Cortisol-3-CMO) zur Antigen- und Tracerherstellung erforderlich. Hierfür wurde eine spezifische Reaktion entwickelt, die in äquimolaren Mengenverhältnissen, in hohen Konzentrationen, bei Zimmertemperatur, wasserfrei unter Pyridinkatalyse abläuft. Die Reinigung erfolgte mit einer präparativen Dünnschichtchromatographie, wobei die Banden im UV-Licht sichtbar gemacht wurden. Der Beweis der selektiven Umsetzung erfolgte durch Infrarot-Spektroskopie.

Das Cortisol-3-CMO wurde mit der gemischten Anhydrid-Methode an Tyrosinmethylester (TME) bzw. Tyramin gekoppelt und dann mit ^{125}J mit der Chloramin-T-Methode markiert. Die Vorreinigung erfolgte durch Ausschütteln in Essigsäure-äthylester, die Tracerreinigung mit der Dünnschichtchromatographie. Aus Empfindlichkeitsgründen konnte nur das TME-Derivat verwendet werden. Die Haltbarkeit des Tracers betrug bei einer Ausgangsmaximalbindung von 90 % und einer unspezifischen Bindung von 5 % mehrere Monate.

Sowohl mit der Carbodiimid- als auch mit der gemischten Anhydrid-Methode wurde das Cortisol-3-CMO an Thyreoglobulin zur Antigenherstellung gekoppelt. Mit der letzteren Methode gelang eine vierfach höhere Umsetzung, das Reaktionsprodukt ließ sich auch viel einfacher wieder in Lösung bringen.

Ein größerer Teil der so gewonnenen Antiseren zeigte hohe Titer. Dieser stieg z. B. bei einem Kaninchen, das mit einem "Carbodiimid-Antigen" geboostert worden war, nach einer einzigen Boosterung mit einem "gemischten Anhydrid-Antigen" von 1 : 3200 auf 1 : 16.000. Neben einer hohen Spezifität für Cortisol wurde die Affinität im sauren pH-Bereich mit Hilfe des Scatchard-Plot mit einem hierfür selbst entwickelten Rechenprogramm ermittelt (Assoziationskonstante von Antiserum K 9 = $0,11 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$).

Da die Assoziationskonstante des Cortisol-bindenden Globulins im sauren pH-Bereich gegen 0 M^{-1} (bei $\text{pH} = 4$) geht, das Antiserum K 9 aber ein Bindungsoptimum bei $\text{pH} = 4$ hat, konnte man durch Arbeiten bei diesem pH-Wert einen extraktiven Schritt vermeiden. Der Assay wurde mit Hilfe eines optimierten Doppelantikörper-Prinzips durchgeführt. Dabei wird eine Mischung von zweitem Antikörper und Polyäthylenglykol (PEG) in nicht fällbarer Konzentration (6g%) eingesetzt. Die Zeit für die Reaktion zwischen erstem und zweitem Antiserum beträgt dann nur eine Stunde (für Calcitonin sogar nur wenige Minuten!) und die Stabilität der Komplexe bleibt über mehrere Stunden erhalten, ohne daß ein Verlust an Bindung oder Spezifität entsteht.

Durch Einsatz eines modularen Analysensystems ist der Assay automatisierbar. Er ist schnell, d. h. Inkubationszeiten von 75 bzw. 60 Minuten, und verfügt über eine große Kapazität bis zu mehreren hundert Bestimmungen in einem Ansatz. Die notwendigen Qualitäts- und Richtigkeitskontrollen

wurden durchgeführt: Die Intraassayvariationskoeffizienten (= VK) ergaben ein typisches Parabelprofil, d. h. im steilen Eichkurvenbereich ($\bar{x} \pm s = 16,48 \pm 0,75 \mu\text{g}\%$) betrug der VK = 4,52 %, bei sehr niedrigen ($\bar{x} \pm s = 1,46 \pm 0,24 \mu\text{g}\%$) bzw. bei sehr hohen Werten ($\bar{x} \pm s = 83,25 \pm 13,32 \mu\text{g}\%$) VK = 16,40 bzw. 15,19 %. Der Interassay-VK betrug für ein Kontrollserum ($\bar{x} \pm s = 17,40 \pm 1,90 \mu\text{g}\%$) 10,5 %. Die Wiederfindequote einer bekannten Menge kalten Cortisols betrug im Bereich von 1 - 50 $\mu\text{g}\%$ 95,70 $\pm$ 7,20 % ($\bar{x} \pm s$). Die Werte von Patientenserum mit Nullserum geometrisch verdünnt lagen jeweils auf einer Geraden. Die Korrelation beim Vergleich dieses Assays mit anderen Cortisol-RIA war gut ($r = 0,94$ bzw. $r = 0,87$).

Die radioimmunologische Bestimmung für menschliches Calcitonin wurde verbessert. Dabei liegt die Gesamtdauer der Bestimmung unter 24 Stunden. Zur Trennung von gebundenem und freiem Hormon wird ebenfalls die optimierte Doppelantikörperfällung mit PEG eingesetzt. Das Antiserum wurde bezüglich seiner Affinität zu menschlichem Calcitonin unter Einsatz des Scatchard-Plot untersucht (Assoziationskonstante = $0,31 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1}$ bzw. $0,28 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$). Der Intraassay-VK im hohen ($\bar{x} \pm s = 8,72 \pm 1,07 \mu\text{g} \cdot \text{Liter}^{-1}$) und im mittleren Eichkurvenbereich ($\bar{x} \pm s = 0,81 \pm 0,07 \mu\text{g} \cdot \text{Liter}^{-1}$) betrug 12,30 bzw. 9,40 %, der Interassay-VK für zwei Kontrollseren ($\bar{x} \pm s = 0,14 \pm 0,02$ und $5,18 \pm 0,63 \mu\text{g} \cdot \text{Liter}^{-1}$) betrug 16,50 bzw. 12,30 %. Die Wiederfindenquoten im Bereich von 0,15 - 10 $\mu\text{g} \cdot \text{Liter}^{-1}$ lauteten 99,80 $\pm$ 13,30 % ($\bar{x} \pm s$). Serumverdünnungsreihen von Patienten mit erhöhten Calcitoninkonzentrationen bei medullärem Schilddrüsenkarzinom lagen stets auf der Standardkurve im Nullserum. Zur Herstellung von "Calcitonin-freiem" Serum verwendeten wir die Florisilextraktion.

Signifikant erhöhte Calcitonin-Konzentrationen fanden sich in einer Gruppe von Patienten mit medullärem Schilddrüsenkarzinom und bei zwei Patienten mit zusätzlichem Phaeochromocytom (= multiple endokrine Adenomatose, Typ II). Zur Erfassung von Calcitonin bzw. von Calcitonin-ähnlichen Peptiden als Tumormarker bei Patienten mit Bronchialkarzinom eignete sich dieser Calcitoninassay nicht.

5. LITERATUR

1. ABRAHAM, G. E.
Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17 β
J. Clin. Endocr. 29 (1969) 866
2. ALLEN, R. M., and M. R. REDSHAW
The use of homologous and heterologous ¹²⁵I-
radioligands in the radioimmunoassay of pro-
gesterone
Steroids 32 (1978) 467
3. BAYARD, T., J. Z. BEITUS, A. KOWARSKI and
C. J. MIGEON
Measurement of aldosterone secretion rate by
radioimmunoassay
J. Clin. Endocr. 31 (1970) 507
4. BENNHOLD, H.
Über die Vehikelfunktion der Serumweißkörper
Ergebn. inn. Med. Kinderheilk, 42 (1932) 237
- 4a. BERNUTZ, C., W. O. HÄNSLE, K. HORN, C. R. PICKARDT,
P. C. SCRIBA, E. FINK, H. KOLB and H. TSCHESCHE
Isolation, characterization and radioimmunoassay
of corticosteroid-binding globulin (CBG) in
human serum - clinical significance and comparison
to thyroxine-binding globulin (TBG)
Acta Endocrinologica 92 (1979) 370
5. BORCH, R. F., M. D. BERNSTEIN, and H. DUPONT DURST
The cyanohydridoborate anion as a selective
reducing agent
J. Amer. Chem. Soc. 93 (1971) 2897
6. BRAUCH, W.
Programmierung mit Fortran
Teubner Studienskripten, 2. Auflage 1974
7. BRAUN, J.
Automatisierung der Bestimmung der Bindung von
Cortisol an Serumproteine und des Gesamt-Cortisols
im Serum (Competitive Protein-Bindungsanalyse)
Inauguraldissertation Universität München 1974

8. BRUNNELLI, B.
Sulla funzione veicolante delle proteine
plasmatiche per l'ormone follicolare
Arch. int. Pharmacodyn. 49 (1934) 262
9. BUCHBORN, E., H. JAHRMÄRKER, H. J. KARL, G. A.
MARTINI, W. MÜLLER, G. RIECKER, H. SCHWIEGK,
W. SIEGENTHALER, W. STICH
Therapie innerer Krankheiten
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
515 (1973)
10. BUSH, I. E.
The physiochemical state of Cortisol in blood
In: Hormons in blood
Ciba Found. Colloq. Endocrinol. Vol. 11, Eds.
Wolstenholme, G. E. W. and E. C. P. Millar
Boston: Little, Brown and Co. (1957) 263
11. CAMPBELL, R. C.
Statistische Methoden für Biologie und Medizin
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1971)
12. CHAN, D. W. and J. R. SLAUNWHITE
The chemistry of human transcortin
Arch. Biochem. Biophys. 182 (1977) 437
13. COPP, D. H., E. C. CAMERON, B. A. CHENEY, A. G. F.
DAVIDSON, K. G. HENZE
Evidence for calcitonin - a new hormone that
lowers blood calcium
Endocrinology 70 (1962) 630
14. DAWSON, E. C., F. KURZER and K. DOURAGHI-ZADEK
Advances in the chemistry of carbodiimides
Chemical Reviews 67 (1967) 107
15. DAWSON, E. C., AdE.H.C. DENISSEN and B. K. van WEEMEN
A simple and efficient method for raising steroid
antibodies in rabbits
Steroids 31 (1978) 357
16. DEFTOS, L. J.
Immunoassay for human calcitonin. I. Method
Metabolism 20 (1971) 1122

17. DESBUQUOIS, B., and G. D. AURBACH
Use of polyethylene glycol to separate free
and antibody-bound peptide hormones in RIA's
J. Clin. Endocr. 33 (1971) 732
18. DOCUMENTA GEIGY
Wissenschaftliche Tabellen
7. Auflage(1968) 719
19. DONALD, R. A.
Application of the coated charcoal separation
method to the radioimmunoassay of plasma corti-
cotropin
J. Endocr. 41 (1968) 499
20. DAUGHADY, W. H.
Evidence for two corticosteroid binding systems
in human plasma
J. Lab. Clin. Med. 48 (1956) 799
21. DUPPEL, W.
Liquid chromatography: the influence of gel
characteristics and composition upon the solution
G-I-T Fachzeitschrift für Laboratorium 22 (1978)586
- 21.a. EHRMANN, C.
Dissertation, Universität München, in Vorbereitung
22. ERHARDT, F., I. MARSCHNER, C. R. PICKARDT, P.C.SCRIBA
Verbesserung und Qualitätskontrolle der radio-
immunologischen Thyreotropin-Bestimmung
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 11 (1973) 381
23. ERLANGER, B. F., F. BOREK, S. M. BEISER, and S.
LIEBERMAN
Steroid-protein conjugates
I. Preparation and characterization of conjugates
of bovine serum albumin with testosterone and
with cortisone
J. Biol. Chem. 228 (1957) 713

24. ERLANGER, B. F., S. M. BEISER, F. BOREK, F. EDEL
and S. LIEBERMAN
The preparation of steroid-protein conjugates
to elicit antihormonal antibodies
Methods in Immunology and Immunchemistry 1
(1967) 144
25. FAHMY, D., G. F. READ and S. G. HILLIER
In human plasma by radioimmunoassay using anti-
sera against cortisol-3-BSA
Steroids 26 (1975) 267
26. GANONG
Lehrbuch der Med. Physiologie
Springer-Verlag, 3. Auflage(1974) 346
27. GERB, A. C.
Eine verbesserte fluorimetrische Methode zur
Bestimmung von "Cortisolspiegeln" im Serum
Dissertation, Universität München, 1969
28. GOODFRIEND, L., and A. H. SEHON
in Immunological Methods in Steroid Determination
(F. G. Peron and B. V. Caldwell, eds.)
Appleton-Century-Crofts, New York (1970) 15
29. GREWITZ, G., and YALOW, R. S.
Ectopic ACTH production in carcinoma of the lung
J. Clin. Invest. 53 (1974) 1022
30. GROSS-SCHÖLMERICH
Lehrbuch der Inneren Medizin
F. K. Scheltener Verlag Stuttgart-New York,
5. Auflage(1977) 727
31. HASLER, M. J., K. PAINTER, and G. D. NISWENDER
An ¹²⁵I-labelled cortisol radioimmunoassay in
which serum binding proteins are enzymatically
denatured
Clin. Chem. 22/11 (1976) 1850

32. HEHRMANN, R., R. WILKE, J. P. NORDMEYER und
R. D. HESCH
Hochsensitiver, C-terminal-spezifischer RIA
für menschliches Parathormon als Routinemethode
Dtsch.Med. Wschr. 101 (1976) 1726
33. HEYL, F. W., and M. E. HERR
"Enamine" derivatives of steroidal carboxyl
compounds
J. Amer. Chem. Soc. 75 (1953) 1918
34. HILLYARD, C. J., R. C. COOMBES, P. B. GREENBERG,
L. S. GALANTE, I. MAC INTYRE
Calcitonin in breast and lung cancer
Clin. Endocr. 5 (1976) 1
35. HORN, K. J., J. HENNER, O. A. MÜLLER, P. C. SCRIBA
Mechanierte Hormonanalytik mittels simultaner
Säulenchromatographie
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 13 (1975) 173
36. HORN, K.
Trijodthyronin (T_3):
Zur Bestimmung und pathophysiologischen Bedeutung
Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien 1976
37. HUNTER, W. M., and F. C. GREENWOOD
Preparation of iodine-131 labelled human growth
hormone of high specific activity
Nature (London) 194 (1962) 485
38. IVERIUS, P. H. and T. C. LAURENT
Precipitation of some plasma proteins by the
addition of dextran or polyethylene glycol
Biochim. Biophys. Acta 133 (1967) 371
39. JAFFE, B. M., H. R. BEHRMAN
Methods of hormone radioimmunoassay
Academic Press, Inc., New York and London 1974
40. JANOSKI, A. H., F. C. SHULMAN and G. E. WRIGHT
Selective 3-(O-carboxymethyl) oxime formation
in steroidal 3,20-diones for hapten immunospecificity
Steroids 1 (1974) 49

41. KLEINHAMMER, G., H. LENZ, R. LINKE, K. H. SCHRAPPE,
F. STAEHLER
Enzyme immunoassay for determination of serum
thyroxine in antibody coated tubes
Europ. Thyroid Association, Lyon, 1977
42. KUMAR, M. S., A. M. SAFA, and S. D. DEODHAR
Radioimmunoassay for serum cortisol with ^{125}I -
labelled ligand: Comparison of three methods
Clin. Chem 22/11 (1976) 1845
43. KUSCHINSKY, G., H. LÜLLMANN
Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 6. Auflage (1974) 178
44. LABHART, A.
Klinik der inneren Sekretion
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
2. Auflage (1971) 301, 347
45. LINDBERG, P., L. E. EDQUIST
The use of $^{17\beta}$ -oestradiol-6-(O-carboxymethyl)
oxime- (^{125}I) tyramine als tracer for the radio-
immunoassay of $^{17\beta}$ -oestradiol
Clin.Chim.Acta 53 (1974) 169
46. MARSCHNER, I., H. DOBRY, F. ERHARDT, T. LANDERSDORFER,
B. POPP, C. RINGEL und P. C. SCRIBA
Berechnung radioimmunologischer Meßwerte mittels
Spline-Funktionen
Ärztl. Labor 20 (1974) 184
47. MARSCHNER, I., F. W. ERHARDT, P. C. SCRIBA
Calculation of the radioimmunoassay standard
curve by "spline function"
In: Radioimmunoassay and related Procedures in
Medicine, Vol. 1, 111.
Proceedings. Symposium Istanbul, Intern. Atomic
Energy, Vienna (1974)
48. MARSCHNER, I., F. ERHARDT, J. HENNER, P.C. SCRIBA
A modular analyzer system for double antibody RIA
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 13 (1975) 481

49. MICKHAIL, G., C. H. WU, M. FERRIN and R. L. VAN de WIELE
Radioimmunoassay of plasma estrone and estradiol
Steroids 15 (1970) 333
50. MIGEON, C. J., F. H. TYLER, J. P. MAHONEY, H. A. FLORENTIN, H. CASTLE, E. L. BLISS, and L. T. SAMUELS
The diurnal variation of plasma levels and urinary excretion of 17-hydroxycorticosteroids in normal subjects, night workers and blind subjects
J. clin. Endocr. 16 (1956) 622
51. MONDER, C.
Stability of corticosteroids in aqueous solutions
Endocrinology 82 (1968) 318
52. MÜLLER, K. H., I. STRECKER
Fortran, Programmieranleitung
B. I. Hochschultaschenbücher, 2. Auflage 1970
53. MÜLLER, O. A., R. FINK, X. BAUR, M. EHBAUER, M. MADLER und P. C. SCRIBA
ACTH im Plasma: Extraktion und Bestimmung
G.I.T. Labormedizin 2 (1978) 117
54. NAHRS, P. W., M. STAHL, M. DAMBACHER, J. BAUMANN and J. GIRARD
On the use of a peptidase inhibitor (Trasyolol) for storage of ^{125}I -labelled peptide hormones
Experienta 28 (1972) 213
55. NEUMANN, G. und H. PERLMUTTER
Optimierungsmöglichkeiten bei Gelfiltration
G-I-T Fachzeitschrift für Laboratorium 8 (1977) 662
56. NIESCHLAG, E. and E. J. WICKINGS
A review of radioimmunoassay for steroids
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 7 (1975) 261
57. ODELL, W. D. and W. H. DAUGHADAY
Principles of competitive protein-binding assays
J. B. Lippincott Company, Philadelphia and Toronto (1971) 158

58. ODELL, W. D.
We don't look at hormones the way we used to
In: Radioimmunoassay and Related Procedures
in Medicine, 1977, IAEA, Vienna (1978) 3
59. OLIVER, G. C., B. M. PARKER, D. L. BRASFIELD, and
C. W. PARKER
The measurement of digitoxin in human serum by
radioimmunoassay
J. Clin. Invest. 47 (1968) 1035
60. PINCUS, G.
A diurnal rhythm in the excretion of urinary
ketosteroids by young men
J. Clin. Endocr. 3 (1943) 195
61. POLSON, A., G. M. POTYIETER, J. F. LARGIER, G. E.
F. MEARS, and F. J. JOLLBERT
The fractionation of protein mixtures by linear
polymers of high molecular weight
Biochem. Biophys. Acta 82 (1964) 463
62. RAUE, F., H. MINNE, W. STREIBL, R. ZIEGLER
Calcitonin radioimmunoassay: Clinical application.
In: Radioimmunoassay and Related Procedures in
Medicine, 1977, IAEA, Vienna (1978) 413
63. ROTH, J. W., S. M. GLICK, R. S. YALOW, and S.A.BERSON
Secretion of human hormone: Physiologic and
experimental modification
Metabolism 12 (1963) 577
64. ROTH, J. W., S. M. GLICK, R. S. YALOW, and S.A.BERSON
Hypoglycemia: A potent stimulus to secretion of
growth hormone
Science 140 (1963) 987
65. SCATCHARD, G.
The attractions of proteins for small molecules
and ions
Ann. N. Y. Acad. Sci. 51 (1949) 660
66. SCHETTLER, G.
Innere Medizin
Georg-Thieme Verlag, Stuttgart, 3. Auflage,
Band II (1972) 406

67. SCHWETLICK, K.
Organikum
Deutscher Verlag der Wissenschaften, 15. Auflage (1977)
68. SCOTT, J. Z., F. Z. STANCZYK, U. GOEBELSMANN, and D. R. MISHELL, Jr.
A double-antibody radioimmunoassay for serum progesterone using progesterone-3-(O-carboxymethyl) oximino-(¹²⁵I)-iodo-histamine as radioligand
Steroids 31 (1978) 393
69. SETH, J., A. D. TOFT and W. J. IRVINE
Simple solid-phase radioimmunoassays for total triiodothyronine and thyroxine and their clinical evaluation
Clinica Chimica Acta 68 (1976) 291
70. SIEGENTHALER, W.
Klin. Pathophysiologie
Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 3. Auflage (1976) 324
71. SIEMENS
Geräte und Bausteine für die Datentechnik
Modell 404/3, Beschreibung Mai 1973
72. SILVA, O. L., K. L. BECKER, A. PRIMACK, J. L. DOPPMANN, R. H. SNIDER
Increased serum calcitonin levels in bronchogenic cancer
Chest 69 (1976) 495
73. SOFRONIEW, M. V., M. MADLER, O. A. MÜLLER, and P. C. SCRIBA
A method for the consistent production of high quality antisera to small peptide hormones
Fresenius Z. Anal. Chem. 290 (1978) 163
74. STALLA, G., O. A. MÜLLER, W. G. WOOD, and P. C. SCRIBA
Problems in automation of serum cortisol RIA
Fresenius Z. Anal. Chem. 290 (1978) 168

75. STALLA, G., G. GIESEMANN, O. A. MÜLLER, W. G. WOOD,
and P. C. SCRIBA
A Non-Extractive and Specific Radioimmunoassay
for Cortisol: Results using a pure Cortisol-C
3-Derivative for Antigen and Tracer Production
Fresenius Z. Anal. Chem. 301 (1980) 129
76. STEINER, A. L., A. B. GOODMAN, S. R. POWERS
Study of a kindred with pheochromocytoma,
medullary thyroidcarcinoma hyperparathyroidism
and Cushing's disease: multiple endocrine ne-
plasia, Type 2
Medicine (Balt) 47 (1968) 371
77. TASHJIAN, A. H. Jr., K. E. W. MELVIN
Medullary carcinoma of the thyroid gland: studies
of thyrocalcitonin in plasma and tumor extracts
New, Engl. J. Med. 279 (1968) 279
78. TASHJIAN, A. H. Jr., B. G. HOWLAND, K. E. W. MELVIN,
C. S. HILL Jr.
Immunoassay of human calcitonin: Clinical measure-
ments relation to serum calcium and studies in
patients with medullary carcinoma
N. Engl. J. Med. 283 (1970) 890
79. TASHJIAN, A. H. Jr., H. W. WOLFE, E. F. VOEKEL
Human calcitonin - immunologic assay, cytological
localisation and studies on medullary thyroid
carcinoma
Amer. J. Med. 56 (1974) 840
80. WEIR, D. M.
In: Immunology for Undergraduates
Churchill Livingstone, London (1973) 14
81. WELLS, S. A. B. A. ONTJES, C. W. COOPER, J. F. HENNESSY,
G. J. ELLIS, H. T. Mac PHERSON, and D. C. SALASTON
The earlier diagnosis of medullary carcinoma of
the thyroid gland in patients with multiple endo-
crine neoplasia type II
Ann. Surg. 182 (1975) 362

82. WESTPHAL, U.
Zur Bindung von Steroidhormonen an Serum-Proteine
Klin. Wschr. 55 (1977) 877
83. WIDE, L., S. J. WILLINS, C. GEMZELL, P. ROSS
Radioimmunosorbend assay of follicle stimulating
hormone and luteinising hormone in serum and urine
from men and women
Acta Endocr. (Kbh.) 72 (1973) 174
84. WILLIAMS, D. H., und J. FLEMING
Spektroskopische Methoden in der Chemie
Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1971)
85. WILLIAMS, E. D., Cl. BROWN, I. DONIACH
Pathological and clinical finding in a series of
67 cases of medullary carcinoms of the thyroid
J. Clin. Path. 19 (1966) 103
86. WOOD, W. G., G. KUFLICKI, I. MARSCHNER, and P.C. SCRIBA
Rapid and sensitive assays for human parathyrin
Acta Endocrin. (Kbh.) 215 (1978) 116
87. WOOD, W. G., I. MARSCHNER und P. C. SCRIBA
Radioaktive Isotopen in Klinik und Forschung
13. Band, Gasteiner Internationales Symposium
(Höfer, R. ed.) Verlag H. Egermann, Wien (1978) 479
88. WOOD, W. G., I. MARSCHNER
Comparison of different labelling and separation
techniques in the production of a stable ^{125}I -
bovine parathyrin tracer
Acta Endocrin. (Kbh.) 215 (1978) 113
89. WOOD, W. G., G. STALLA, O. A. MÜLLER, and P. C. SCRIBA
A rapid and specific method for separation of
bound and free antigen in radioimmunoassay-systems
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17 (1979) 111
90. WOOD, W. G., I. MARSCHNER, P. C. SCRIBA
Tests in three antisera and subsequent development
of radioimmunoassays for different regions of human
parathyrin
Horm. Metab. Res. 11 (1979) 309

91. WOOD, W. G., G. STALLA and P. C. SCRIBA
Development of rapid and sensitive assays
for human Parathyrin and Calcitonin
IVE Colloque de Radioimmunologie de Lyon (1979)
92. WOOD, W. G., O. A. MÜLLER, G. STALLA and P. C. SCRIBA
Improvement of the calcitonin-radioimmunoassay
J. Clin. Chem. Clin. Biochem 17 (1979) 781
93. YALOW, R. S. and S. A. BERSON
Immunoassay of endogenous plasma insulin in man
J. Clin. Invest. 39 (1960) 1157

LEBENS LAUF

Als erster von zwei Söhnen des Studiendirektors Robert Stalla und seiner Ehefrau Gertraud, geb. Gropper, wurde ich am 10. 12. 1953 in Raubling, Kreis Rosenheim, geboren.

Die Volksschule besuchte ich von 1960 bis 1964 in Kirchdorf, Gemeinde Raubling, und anschließend das Staatliche Finsterwalter-Gymnasium (mathematisch-naturwissenschaftlich) in Rosenheim, an dem ich im Frühjahr 1973 das Abitur bestand.

Danach begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München mit dem Studium der Chemie und von 1973 - 1978 mit einer Ausbildung zum Operator und Programmierer am Leibnitz-Rechenzentrum der Bayerischen Akademie der Wissenschaften. Ab dem Sommersemester 1974 studierte ich, ebenfalls an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Medizin. Die vorärztliche Prüfung bestand ich im Herbst 1976 und den 1. und 2. Teil der ärztlichen Prüfung 1977 bzw. 1979. Mein Studium beendete ich im Mai 1980 mit dem 3. Teil der ärztlichen Prüfung.

Seit Frühjahr 1977 arbeite ich in den Laboratorien für Klinische Chemie und Endokrinologie (Leiter: Professor Dr. med. P. C. Scriba) der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München (Direktor: Professor Dr. med. E. Buchborn) bei Herrn Priv. Doz. Dr. med. O. A. Müller und Herrn Dr. W. G. Wood an einer Dissertation über Aufbau und Optimierung radioimmunologischer Meßmethoden. Hierfür arbeitete ich vom Frühjahr 1978 bis zum Sommer 1979 zusätzlich bei Herrn Dipl. Chem. Giesemann im Organisch-Chemischen Institut Garching der TU München.

